UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

Nuevas aportaciones epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de la interacción entre la fauna doméstica y silvestre

New epidemiological and diagnostic contributions to the study of the interaction between livestock and wildlife

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Rodríguez Prieto

Directores

José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez
Joaquín Goyache Goñi

Madrid, 2014

©Víctor Rodríguez Prieto, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

CENTRO VISAVET

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

NUEVAS APORTACIONES EPIDEMIOLÓGICAS Y DIAGNÓSTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FAUNA DOMÉSTICA Y SILVESTRE

NEW EPIDEMIOLOGICAL AND DIAGNOSTIC CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN LIVESTOCK AND WILDLIFE

Víctor Rodríguez Prieto

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez y

el Prof. Dr. Joaquín Goyache Goñi

Madrid 2014

D. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

D. Joaquín Goyache Goñi, Doctor en Veterinaria, Profesor Titular de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y Vicerrector de Postgrado y Formación Continua de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D. Víctor Rodríguez Prieto, licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado 'NUEVAS APORTACIONES EPIDEMIOLÓGICAS Y DIAGNÓSTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FAUNA DOMÉSTICA Y SILVESTRE' y consideran que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a de de 2014

Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Prof. Dr. Joaquín Goyache Goñi

AGRADECIMIENTOS

Fuente: imagen propia tomada en el Blijdorp Zoo (Róterdam)

AGRADECIMIENTOS

Entiendo que este es el momento del doctorado (que no quita que se haya podido hacer antes, durante o después) de agradecer y reconocer a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado en la culminación del mismo con esta tesis doctoral. Nunca fui una persona con capacidad de síntesis, pero creo que este es precisamente uno de los momentos en los que puedo y tengo que explayarme.

Durante este tiempo he reconocido la intervención de cinco pilares sobre los que me he apoyado para completar esta etapa. El primero de ellos lo forman mis **directores de tesis**, José Manuel y Joaquín. A ellos les tengo que agradecer la confianza y el esfuerzo depositados en mí desde hace mucho tiempo. A **Joaquín** por esa paciencia infinita y esa capacidad de ver las cosas de manera positiva, con una sonrisa. Y a **José Manuel**, por hacerme crecer y ser más fuerte cada día, no solo como científico, sino como persona. Me llevo muchas enseñanzas de esos encuentros intensos (sobre todo la importancia de los "titulares en los ascensores"). Y por esa capacidad de resolver con unos simples trazos de pilot sobre un cuaderno problemas que se antojaban imposibles de solucionar. Gracias por vuestra dedicación y apoyo.

En segundo lugar, han sido varios los **organismos e institutos** que han hecho posible que pueda tener este documento entre las manos. Empezando por el **Ministerio de Educación**, el cual ha financiado mis años de doctorado desde el programa FPU, y la **Universidad Complutense**. Dentro de la misma me siento muy unido a la **Facultad de Veterinaria**, en la que he pasado probablemente más horas en estos diez años que en cualquier otro sitio en toda mi vida. En ella he estado muy vinculado al **Departamento de Sanidad Animal**. Quería agradecer a los profesores del mismo, en particular a Carmen, Lola, José Antonio, Ana y José Luis por haberme dejado hacer un poquito de lo que tanto me gusta y por lo que decidí embarcarme en esta aventura del doctorado, la docencia. También a Alicia Gibello y a Gustavo y su grupo por haber facilitado con tanta amabilidad sus equipos para completar mis trabajos, y al equipo de Bruno al completo, por estar siempre dispuestos a compartir buenos momentos. También me gustaría agradecer a Virginia, Reme, Flora, Agustín, Reyes y Abby por hacer más agradable el día a día por el departamento. Aunque de otro departamento, un guiño especial a Mariló, por saber, sin preguntar, que siempre está ahí.

Hay cuatro centros con los que me he sentido muy ligado este tiempo. De **VISAVET** me llevo la experiencia de haber podido trabajar en un laboratorio P3, de la cual tengo que destacar el apoyo de María, Pedro, David y Laura. Del **CISA**, aunque no he podido visitarlo más que una vez, me quedo con lo cercano que me he sentido siempre a ellos, en especial a María Jesús,

Irene, Ana y Jaime. Del **Oceanogràfic** quiero agradecer a Dani, Mónica, Teresa y Ani (porque para mí siempre serás "Oce") el haberme hecho disfrutar tanto de la veterinaria, y por hacer que desde 2007 me siga sintiendo parte de su equipo. Y del **IREC**, que me acogió desde el primer día y que podría considerar como "mi segundo departamento" durante el doctorado, tengo que destacar la calidez y el entusiasmo con el que siempre me han atendido, la energía que transmiten y contagian en todo lo que hacen y la oportunidad de sacarme de mi "jungla de cemento" para estar un poco cerca del "mundo silvestre". Tanto a los becarios (Iratxe, Mariana, José Ángel, Elisa, Valeria y Bea) como a **Joaquín y Christian**, que siempre habéis estado dispuestos a echar un cable en todo lo que haya hecho falta.

I should make a special acknowledgement to the **Erasmus Medical Center**, which "sheltered" me during my stay in Rotterdam. I will never forget the first time I entered in the building, pushed the lift button to the 17th floor, and met such a big group of people full of energy while holding a beer with one hand and an oily lumpia, a notebook and a pen with the other one. I would like to thank the wildlife group (especially Debbie and Lonneke, for making me feel at home) and Thijs Kuiken, for being such a good host. Many thanks also to Byron Martina and all those people who helped me in the diving to the glycoprotein expression and the elephant's world. But my most special gratitude to **Petra**, for becoming not only a good colleague and teacher, but also a good friend.

También he tenido la posibilidad de colaborar con Zoetis (en especial el centro de Olot y Emilio Legaz), INGENASA, COLVETSE, la Junta de Castilla y León, ANSES, RVC y FLI. Gracias a todos por vuestro tiempo y contribución en esta tesis.

La variedad de trabajos en los que he estado involucrado han hecho de estos años, cuanto menos, una aventura. Nunca habría sido tan "trepidante" si no hubiera sido gracias al tercer pilar, el **equipo SUAT**. Aunque el primer contacto fue en 2006, hasta 2009 no tuve mi huequito en aquella salita del "fondo", pequeña por fuera, pero muy grande por dentro. Estoy 100% seguro que sin el apoyo, cariño y dedicación de vosotros nunca habría completado estas páginas. Me siento muy agradecido de haber formado parte de un grupo "grande", no solo por la calidad profesional, sino por la calidad humana, que esa no se mide por trienios, *person-months* o índices de impacto, sino por los pequeños y grandes gestos del día a día. Aquí he de reconocer una vez más la labor de **JM**, por saber elegir tan bien "el ganado" (tú ya me entiendes), hasta cuando llega en "rebaños".

De "el fondo" me llevo grandes recuerdos. Momentos emocionantes. Momentos frustrantes. "Pisquislabis". "Gazpachos". Susurros. Gritos. Buenas y malas noticias. Pero todos ellos vividos con "compañeros y sin embargo amigos". **Ana Cristina**, porque siendo tan distintos somos muy

iguales (te debo la visita a Toledo, que conste en "tesis"). **Facundo**, porque un "capás" vale más que mil palabras. **Lina**, por ser mi gemela de plazos, papeles y firmas, siempre en paralelo. **Ana**, porque fue breve, pero intenso. **Mar** (ya que en el fondo eres de "el fondo"), gracias por haber vuelto a hacerme pasar grandes momentos como en 2007 y por dejar que siga siendo tu consorte, *Thermo Queen*. **Almu**, gracias por estar siempre a mi lado (últimamente hasta en el sentido literal), aportar a mi vida un nuevo refranero español y enseñarme que la vida con Amezola sabe mejor. **Marina**, gracias por tu incondicional apoyo durante todos estos años, por sudar juntos todos los proyectos que se nos han puesto por delante y por tu risa contagiosa, tan necesaria en tantos momentos. **Chelo**, gracias por darle ese toque alegre y loco a la rutina, por haberme ofrecido tu confianza, tu amistad y tu cariño desde el primer día y por creer siempre en mí. Chicas, nunca pensé que hacer chocolatinas fuera tan divertido.

En la sala de al lado, aunque que de zen tenga poco, también he pasado grandes momentos con grandes personas. **Bea**, por haber dedicado tantísimas horas a enseñarme cómo funciona el mundo en clave de Bayes y R. **Debo**, por tirar siempre de mí con esa energía inagotable y ver siempre el vaso medio lleno. **Marta**, por transmitirme siempre tu amor por la ciencia y por compartir conmigo grandes pensamientos sobre la detección precoz, las migraciones de aves y la felicidad. **Fer y Eduardo**, por ser tan buenos compañeros de viaje y por saber poner la Y en un grupo imperado por la X. **Elvira**, porque, aun habiendo llegado la última, te has hecho un hueco muy grande, fruto de lo grande que eres. Mil gracias por tu generosidad, tu compañerismo y tu dulzura (aderezada siempre con esa "delicadeza" con D.O. Moral de Calatrava).

No iba a dejar de mencionar a las personas del labo 106 (porque para mí siempre seréis de ahí). Cuatro personas que me han enseñado lo importante que es en la ciencia la paciencia, que me han ayudado a levantarme incluso antes de haberme tropezado y que me han ayudado a crecer en todos los sentidos de la palabra. **Raquel**, por darme esa manera de ver las cosas, por estar siempre dispuesta a echar una salsa y por ser una gran confidente. **Roci**, por hacer que hasta las extracciones infinitas sean divertidas, por enseñarme que todo en la vida puede ir "compañero" (solo hay que saber buscar bien) y por ese corazón tan grande. **Belén**, por no haber papel suficiente para agradecer todo el apoyo que me has dado durante estos años, a veces a modo de bronca, a veces a modo de banquete, con conversaciones bajo la lluvia, recién levantados, de madrugada profunda, ayudándome en el laboratorio, en tu casa, en los caminos en coche, con velas, hasta con cuentos. Eres muy grande, que nunca se te olvide. Y **Adol**, por aportar siempre grandes consejos desde fuera (pero desde dentro), por ofrecer siempre tu

ayuda y por enseñarme que una "caidita de cabeza" a tiempo soluciona males mayores. Aunque esto no compense ni el 1% de lo que os merecéis, desde el cariño: GRACIAS a todos.

El cuarto pilar lo forman afortunadamente muchas personas que tienen pedacitos de mí, a la par que en gran parte conforman lo que soy, **mis amigos**. Todos los que sois fieles e incondicionales, incluso desde cuando empezamos con el babi. Los que habéis aparecido más tarde, pero que siento que habéis estado ahí desde el principio. Con los que se ha puesto distancia o tiempo entremedias, porque los reencuentros en el camino son inolvidables. A todos, gracias. Espero que estas líneas compensen el callo de vuestros tímpanos de tanto oírme hablar de "los *papers*", el "cerdo-jabalí, jabalí-cerdo" o "el virus ese tan raro de Schweppes". Sin vuestro apoyo nunca habría llegado a conseguirlo.

Tengo que hacer una mención especial a **Sara, Esther y Mamen** (mis "tres mosqueteras", las "tres patas de mi banco", las tres piezas que faltan en todos mis puzles, la mezcla perfecta; gracias, chicas); **Ali, Lore, Lara, Gerar y Chuso** (por estar "siempre ahí" desde hace tantísimo tiempo); **Esther y Carlos** (por hacerme sentir parte de vuestra familia, a veces como hijo, a veces como hermano); mis chicos de **Vekavel**, sobre todo a la **Rurru** (que aunque estés tan lejos, sé que estás muy cerca), **Lola y Elvi** (por hacerme ver el mundo como si fuera "una monadita", por ser "taaaan divertidas" y por esas noches de pijama y lambrusco en las que, por lo menos, resolvemos el mundo) y **Miguel y Raquel** (por hacerme pasar tan grandes momentos en el eje Móstoles-Ibiza); a mis compis del "**eje**", sobre todo a **Marina** (siempre serás mi pequeña); y a mis compis de **Mueve-T**. Gracias también a **Gema, Mario, Almu, Tania, Ana y David**, por todas las experiencia vividas juntos, las noches en vela, los viajes en coche (¡coche 2 *forever*!), los nervios previos, la complicidad durante y las risas de después. A **Noelia**, por ayudarme a descubrirme, por transmitirme tu filosofía vital y por disfrutar juntos no solo de las metas, sino también del camino. A **Mari**, por ser única y genuina, por enseñarme a relativizar y por los *cafese*, los *piti* y *todas las cosa* que han venido y que vendrán. Y gracias a **Fito, Agapita, Mara, Tina, Pedrito, Rita y Gala**. Por hacerme sacar el niño que llevo dentro.

Y el quinto pilar, y no por ello menos importante, **mi familia**. Aunque no lo manifieste muy a menudo, no hay palabras de agradecimiento para describir lo que siento por ellos. Todo el mundo piensa que lo suyo es lo mejor, pero creedme, mi familia es increíble. Muchísimas gracias a **mis tíos**, **mis tías**, **mis primos** y **mis primas**. Gracias por estar pendientes de mí en todo momento, en mis éxitos y en mis fracasos, en los momentos grandes y en las cosas pequeñas. Muchísimas gracias a **mis abuelas, Elena y África**, por el amor infinito que me han dado y me dan desde que nací, y por lo que disfruto con las historias sobre sus vidas, sobre mi vida. Y como no, dejo para el final mi agradecimiento a mis padres y mis hermanos. Por

haberme apoyado en todas mis decisiones, por muy erráticas que parecieran. Por haberme transmitido que la experiencia del camino siempre vale más que el éxito. Por sentirme siempre protegido, hasta cuando estoy lejos. Por enseñarme el significado de la palabra FAMILIA. Y porque sin vosotros no sería nada de lo que soy ni habría conseguido nada de lo que tengo. A **Daniel**, porque detrás de ese adolescente tímido hay un tío muy grande. A **Pablo**, por ser no solo mi hermano, sino también compañero, profesor y mejor amigo, y por aguantar estoicamente todas mis plomizas dudas sobre esta tesis. A **Javier**, por ser un guía imprescindible de mis experiencias y mis decisiones, por enseñarme el valor de escuchar, por potenciar mis aCtitudes y mis aPtitudes y por quererme de esa forma tan tuya, pero tan estupenda. Y por último, a **Elena**, porque lo eres todo, por inculcarme la grandeza de las pequeñas cosas, por hacerme ver que "hoy puede ser un gran día" y por ser mi compañera en la búsqueda de la felicidad. Os quiero.

Caminante, son tus huellas el camino y nada más;

caminante, no hay camino, se hace camino al andar.

Antonio Machado (1879-1939)

CONTENIDOS

Fuente de la imagen: Max Smith, cría de morsa de Kamogawa Seaworld [dominio público]

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS v

LISTA DE FIGURAS vii

LISTA DE TABLAS ix

RESUMEN xi

ABSTRACT xv

1. INTRODUCCIÓN 3

1.1 La fauna silvestre en España 3

1.1.1 La biodiversidad española 3

1.1.2 Principales especies de animales silvestres de España 4

1.1.3 Biorregiones de España: reflejo de la biodiversidad 6

1.1.4 Determinantes ecológicos en el cambio del panorama silvestre en la actualidad 8

1.2 Fauna silvestre y enfermedades infecciosas 10

1.2.1 El auge de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre 10

1.2.2 Conceptos relevantes sobre las enfermedades infecciosas 11

1.2.3 Conceptos relevantes sobre los papeles epidemiológicos 13

1.2.4 "Citas célebres" sobre la fauna silvestre y su implicación en las enfermedades infecciosas 14

1.2.5 Factores ecológicos de las enfermedades compartidas 15

1.3 Programas sanitarios para las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre 21

1.3.1 Importancia de la sanidad animal 21

1.3.2 Fases de la gestión sanitaria de enfermedades en fauna silvestre 22

1.3.3 Objetivos de los programas sanitarios para enfermedades infecciosas 26

1.3.4 Ámbito de la vigilancia sanitaria en animales silvestres en el contexto internacional y europeo 28

1.3.5 Componentes de la vigilancia en poblaciones silvestres 31

1.3.6 Programas de vigilancia sanitaria para la fauna silvestre en España 33

1.4 Herramientas epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de las enfermedades en la fauna silvestre 36

1.4.1 Dificultades y limitaciones de la vigilancia en fauna silvestre 36

1.4.2 Nuevos horizontes en la vigilancia en fauna silvestre 38

1.4.3 Herramientas diagnósticas para el estudio de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre 39

1.4.4 Herramientas epidemiológicas para el estudio de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre 42

1.4.5 Los sistemas de información geográfica y sus aplicaciones 44

2. JUSTIFICACIÓN 53

3. OBJETIVOS 57

4. RESULTADOS 61

Objetivo 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y FAUNA SILVESTRE 61

Resumen de los resultados del objetivo 1 63

Objetivo 2: MAPEO DE RIESGO PARA LA EWN 73

Resumen de los resultados del objetivo 2 75

Objetivo 3: ESTUDIO DE LA INMUNIDAD FRENTE A LA INFECCIÓN CON EL VSB 93

Resumen de los resultados del objetivo 3 95

Objetivo 4: MODELO BAYESIANO PARA LA TB 107

Resumen de los resultados del objetivo 4 109

Objetivo 5: ESTUDIO DE ENFERMEDADES ENDÉMICAS EN LA INTERFAZ DS 125

Resumen de los resultados del objetivo 5.....127

Objetivo 6: APLICACIÓN DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA EN MORSAS.....155

Resumen de los resultados del objetivo 6.....157

5. DISCUSIÓN.....173

5.1 Expansión del campo de conocimiento de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre.....174

5.2 El MDMC como herramienta para la mejora de los sistemas de vigilancia: el caso de la EWN.....175

5.3 La inmunidad natural frente al VSB como modelo de una enfermedad emergente nueva.....177

5.4 El modelo bayesiano como herramienta para la mejora del control de enfermedades: el caso de la tuberculosis en la interfaz HDS.....179

5.5 Herramientas diagnósticas para virus compartidos entre animales domésticos y silvestres.....183

5.6 Valor de la termografía como herramienta diagnóstica en fauna silvestre.185

5.7 Implicación de la fauna silvestre en las enfermedades seleccionadas y en su gestión sanitaria.....187

5.8 Perspectivas y líneas de futuro.....194

6. CONCLUSIONES.....199

7. BIBLIOGRAFÍA.....205

8. ANEXOS.....231

Anexo 1. Nomenclatura de las unidades territoriales estadísticas (NUTS) de España con sus respectivos códigos, asociado a las biorregiones.....231

Anexo 2. Lista de las 53 enfermedades que no figuran en la lista de la OIE que afectan a los animales silvestres.....233

Anexo 3. Principales técnicas diagnósticas para su aplicación en fauna silvestre.235

Anexo 4. Aportaciones científicas relacionadas con la detección precoz y la vigilancia de enfermedades emergentes.....237

LISTA DE ABREVIATURAS

- ✓ **5'-UTR**: *5' untraslated region* (región no traducida 5')
- ✓ **BR**: biorregión
- ✓ **CE**: Comisión Europea
- ✓ **CVP2**: circovirus porcino tipo 2
- ✓ **DIVA**: *differentiating infected from vaccinated individuals* (diferenciar infectados de vacunados)
- ✓ **DVB**: diarrea vírica bovina [VDVB: virus de la diarrea vírica bovina]
- ✓ **EFSA**: *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
- ✓ **ELISA**: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- ✓ **ESB**: enfermedad de Schmallenberg [VSB: virus de Schmallenberg]
- ✓ **EWDA**: *European Wildlife Disease Association* (Asociación Europea de Enfermedades de la Fauna Silvestre)
- ✓ **FAO**: Organización de la Naciones Unidas para la Agricutura y la Alimentación
- ✓ **GLEWS**: *Global Early Warning System* (Sistema Global de Detección Precoz)
- ✓ **HE**: hepatitis E [VHE: virus de la hepatitis E]
- ✓ **Interfaz HDS**: interfaz humano-doméstico-silvestre
- ✓ **IUCN**: *International Union for Conservation of Nature* (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)
- ✓ **LA**: lengua azul [VLA: virus de la lengua azul]
- ✓ ***M. bovis***: complejo de *Mycobacterium bovis*
- ✓ **MDMC**: modelo de decisión multicriterio
- ✓ **NUTS**: nomenclatura de las unidades territoriales estadísticas
- ✓ **OIE**: Organización Mundial de Sanidad Animal
- ✓ **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- ✓ **ORF**: *open reading frame* (marco de lectura abierto)
- ✓ **PVSFS**: programa de vigilancia sanitaria de la fauna silvestre

- ✓ **RASVE**: Red de Alerta Sanitaria Veterinaria
- ✓ **R_0**: número básico de reproducción
- ✓ **RT-PCR**: *retrotranscription-polymerase chain reaction* (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa)
- ✓ **SIG**: sistema de información geográfica
- ✓ **SRRP**: síndrome respiratorio y reproductor porcino [VSRRP: virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino]
- ✓ **TB**: tuberculosis bovina
- ✓ **WAHIS**: *World Animal Health Information System* (Sistema Mundial de Información Sanitaria Animal)
- ✓ **WDA**: *Wildlife Disease Association* (Asociación de Enfermedades de la Fauna Silvestre)
- ✓ **EWN**: enfermedad de West Nile [VWN: virus de West Nile]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mamíferos ibéricos silvestres de interés sanitario

Figura 2. Mapa de las biorregiones de España

Figura 3. Diagrama de flujo de patógenos en la interfaz humanos-animales domésticos-fauna silvestre

Figura 4. Comparativa de la difusión tras el primer brote del virus de Schmallenberg (VSB) y el primer brote de serotipo 8 del virus de la lengua azul (VLA-8) en Europa

Figura 5. Esquema de las fases de la gestión sanitaria en fauna silvestre

Figura 6. Ciclo de la enfermedad en relación a los distintos objetivos de vigilancia

Figura 7. Curva epidémica de la enfermedad de West Nile

Figura 8. Principales aplicaciones de la termografía en fauna silvestre

Figura 9. Ejemplo de aplicación de un modelo de decisión multicriterio

Figura 10. Esquema de los diferentes patrones espaciotemporales integrados en los cilindros de Kulldorf

Figura 11. Escenarios epidemiológicos para la tuberculosis bovina en Ciudad Real basados en la abundancia de ganado vacuno y ungulados silvestres

Figura 12. Termogramas que muestran la aparición de ventanas térmicas en distintos individuos de morsas del Pacífico (*Odobenus rosmarus divergens*) tras salir del agua

Figura 13. Composición de termogramas de un individuo de foca común (*Phoca vitulina*) durante una sesión termográfica

Figura 14. Mapa de países afectados en Europa y la cuenca mediterránea en el periodo 2010-2013 por brotes de los linajes 1 y 2 del virus de West Nile

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de especies y porcentaje de endemismos de la fauna silvestre española

Tabla 2. Definiciones relacionadas con la fauna silvestre

Tabla 3. Características de las biorregiones de España

Tabla 4. Características diferenciales de las actividades de vigilancia activa y pasiva contempladas en el programa nacional de vigilancia de fauna silvestre

Tabla 5. Principales enfermedades infecciosas objeto del programa nacional de vigilancia de fauna silvestre

Tabla 6. Países europeos y del entorno mediterráneo afectados por la enfermedad de West Nile en el periodo 2010-2013

RESUMEN

Las enfermedades de la fauna silvestre han ido cobrando importancia debido al papel de los animales silvestres en infecciones con impacto en la sanidad animal, la salud pública y la gestión del medioambiente. El entorno en el que vive la fauna silvestre ha experimentado cambios en los últimos años, muchos de ellos provocados por el hombre, lo que ha promovido la creación de situaciones de interacción entre esta y los animales domésticos y/o los humanos. Gestionar las enfermedades atendiendo a esta interfaz humano-doméstico-silvestre (HDS) es la mejor manera de enfocar los recursos y alcanzar un estatus sanitario adecuado.

Esta tesis doctoral, titulada ***Nuevas herramientas epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de la interacción entre la fauna doméstica y silvestre***, tiene como objetivo principal desarrollar, integrar y aplicar diferentes métodos epidemiológicos y diagnósticos enfocados a varias enfermedades infecciosas utilizadas como modelo de estudio de la interfaz HDS en España. De esta forma se pretenden abarcar varios tipos de enfermedades (*i.e.* nuevas, exóticas y endémicas) así como varios hospedadores (*i.e.* ungulados silvestres, aves silvestres y animales de zoológico). El trabajo desarrollado en la presente tesis comprende seis artículos científicos publicados en revistas de impacto internacional y uno en preparación en los que se describen modelos epidemiológicos, métodos de diagnóstico, estudios inmunológicos y desafíos experimentales, todo ello precedido de una amplia revisión bibliográfica. En concreto, se han resumido todos estos trabajos en los objetivos desarrollados a continuación.

En el estudio incluido en el **objetivo 1** se planteó hacer una **revisión bibliográfica** para centrar cuáles son las especies silvestres y los agentes patógenos que más interés científico han suscitado en los últimos 25 años. La búsqueda, tras depurar la base de datos, derivó en 4.428 artículos. El grupo de animales silvestres más representado fue el de los mamíferos, seguido de los peces y de las aves. Se observó un incremento notable en la tendencia de publicación a lo largo del periodo de estudio, con un aumento muy evidente desde 2009. Esto podría explicarse por el reciente interés en la sanidad de los animales acuáticos o la aparición de ciertos patógenos emergentes, como el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que afecta a los anfibios. Esta revisión deja patente la necesidad de estudio de las infecciones en la fauna silvestre por su impacto sobre sus propias poblaciones, la sanidad animal y la salud pública.

En los objetivos 2 y 3 se tratan dos **enfermedades emergentes vectoriales** de enorme relevancia actual, la enfermedad de West Nile (EWN) y la enfermedad de Schmallenberg (ESB). En el **segundo objetivo**, se planteó un mapeo de riesgo de la EWN en Castilla y León. Para ello, se consideraron varias capas: densidad de équidos, abundancia de aves silvestres e información sobre variables medioambientales y climatológicas con influencia sobre la presencia del vector principal, *Culex pipiens* (*i.e.* presencia de zonas húmedas, temperatura y precipitaciones). Así pues, se obtuvieron distintos mapas de riesgo; uno para el periodo de riesgo global (*i.e.* de abril a octubre) y uno para cada mes. De esta forma, se obtuvieron las zonas de mayor riesgo de la región, distribuidas por todas las provincias. Como meses de mayor riesgo, se destacaron los meses de verano. Comparando estos resultados con el muestreo del programa de vigilancia de EWN y con las zonas de mayor población humana de la comunidad autónoma, se plantearon mejoras en las actividades sanitarias frente a esta enfermedad en Castilla y León, cuya incursión podría conllevar un importante impacto sanitario.

El **objetivo 3** se centra en la ESB, enfermedad vectorial vírica descrita por primera vez a finales de 2011 en la región fronteriza entre Bélgica, Holanda y Alemania. Esta infección tuvo una rapidísima difusión por Europa, llegando a afectar en tan solo seis meses a más de 4.000 explotaciones de rumiantes en ocho países europeos, entre ellos España. Se han planteado varias razones para esta dispersión del virus, como una abundancia de vectores competentes o la implicación de otros reservorios, como los ungulados silvestres. Una de las mayores incógnitas de cara a predecir la difusión de la ESB y controlar futuros brotes era conocer la inmunidad natural obtenida por los animales tras la infección con el virus. Para ello se planteó realizar desafíos experimentales en ovejas procedentes de la única explotación con brote de ESB declarada en España y en corderos nacidos de estas. El estudio concluyó demostrando que las ovejas con anticuerpos frente al virus de Schmallenberg (VSB) ofrecían una resistencia a la inoculación experimental. Del mismo modo, los anticuerpos calostrales transferidos a los corderos parecen suficientes para evitar la infección de estos. Estos resultados tienen una repercusión bastante positiva en el control de la enfermedad, ya que apoyan la teoría de que los animales que ya han estado infectados pueden servir de barrera para la difusión del VSB. Sin embargo, habría que realizar más investigaciones para ver qué relevancia podrían tener los animales silvestres en la circulación y el mantenimiento de la infección.

A su vez, en los objetivos 4 y 5 se tratan **enfermedades endémicas de la región centro-sur de España**. Esta región se caracteriza por una producción del ganado primordialmente en régimen de extensivo, así como un incremento de cotos cinegéticos para satisfacer la gran demanda de animales para la caza, lo que implica que en algunos territorios los animales silvestres cohabitan con el ganado. Por tanto, en estas zonas se crean unas situaciones en las que la interacción entre animales domésticos y silvestres es frecuente, lo que facilita a su vez la transmisión de patógenos. Quizá el patógeno mejor estudiado en este sentido sea *Mycobacterium bovis*, que tiene un rango de hospedadores bastante amplio y que pese a todos los esfuerzos por erradicarlo a nivel nacional, en esta región persiste año tras año, incluso viendo aumentar su incidencia en algunas zonas. Por otro lado, existen otros patógenos, no tan ubicuos y más específicos, cuyo estudio puede ayudar a comprender la importancia de las interacciones en la interfaz DS.

Por ello, en el **objetivo 4**, se realizó un modelo estadístico bayesiano para caracterizar cuáles son los factores de riesgo que operan en la ocurrencia de la tuberculosis bovina (TB) en la interfaz DS en Ciudad Real. De esta forma, se determinó que el riesgo se concentraba en la zona suroeste de la región. Se destacaron también varios factores de riesgo: la ocurrencia de TB en vacas, el muestreo en ganado, los reservorios silvestres (*i.e.* ciervo y jabalí), la gestión en los cotos y la presencia de ganado vacuno en extensivo (*i.e.* para carne y para lidia). Comprender cómo actúa cada uno de estos factores es vital de cara a poder controlar la infección y para plantear programas de erradicación de la TB realistas.

En cuanto al **objetivo 5**, se estudió mediante técnicas virológicas y serológicas la circulación de dos enfermedades víricas en la interfaz DS de la provincia: el síndrome respiratorio y reproductor porcino (SRRP) entre jabalíes y cerdos ibéricos y la diarrea vírica bovina (DVB) entre ciervos, jabalíes y vacas en extensivo. A la luz de los resultados, se plantea que el virus del SRRP no sea un buen marcador de la interacción en la interfaz, al igual que se descarta el papel del jabalí como reservorio de la infección debido a la baja seroprevalencia obtenida y a la detección nula de virus mediante RT-PCR. En cambio, el virus de la DVB parece circular de manera más activa entre las poblaciones de ciervo y vacuno (no entre jabalíes), incluso se sugiere que este pueda estar circulando de manera independiente en las poblaciones de ciervo. De esta forma, se podría utilizar la DVB como marcador sanitario de la interfaz entre rumiantes domésticos y silvestres.

Por último, en el **objetivo 6**, se planteó la aplicación de la **termografía infrarroja** para el estudio de las especies silvestres y el diagnóstico de patologías que cursen con variaciones de temperatura superficial. Para ello, se tomó como modelo un estudio con juveniles de morsa del Pacífico (*Odobenus rosmarus divergens*) mantenidos en cautividad. Tras varias sesiones de adaptación de la técnica y de los animales, se determinó que el proceso de termorregulación tenía lugar mediante el desarrollo de ventanas térmicas a lo largo de todo el cuerpo, pero principalmente en el tronco, en las aletas traseras y en las caderas. A su vez, es importante considerar el tiempo de estabilización de las ventanas térmicas (*i.e.* desde su primera aparición hasta su completo desarrollo). Este mecanismo ha de ser tenido en cuenta a la hora de diagnosticar cualquier patología a través de la termografía infrarroja. Sin embargo, este estudio destaca el potencial de esta técnica para su aplicación en animales silvestres, dada su naturaleza no invasiva y el amplio abanico de aplicaciones que tiene en el diagnóstico de procesos tanto fisiológicos como patológicos.

Los artículos incluidos en esta tesis doctoral incluyen métodos y resultados que son novedosos en el campo de las enfermedades infecciosas y de la fauna silvestre. Además, sirven como modelo para otras enfermedades, especies silvestres o regiones con características similares. Todos los aspectos discutidos en esta tesis doctoral pueden tener una aplicación directa a la vigilancia y el control de enfermedades en poblaciones silvestres, principalmente aquellas transmitidas en la interfaz HDS, cuya inclusión en planes integrales de gestión sanitaria cada vez resulta más primordial.

ABSTRACT

Wildlife diseases have become increasingly important due to the role of wild animals in infections of major impact on animal and public health, as well as in environmental management. The scenario where wild animals inhabit has changed in recent years, mainly due to anthropogenic factors, which have promoted the creation of situations of interaction between wildlife and domestic animals and/or humans. Considering this human-domestic-wildlife interface (HDW interface) when managing infectious diseases is the best way to cost-effectively allocate resources and achieve an adequate health status.

This thesis entitled ***New epidemiological and diagnostic tools for the study of the interaction between domestic and wild animals*** intends to develop, integrate and apply different epidemiological and diagnostic methods focused on various infectious diseases used as a model to study the Spanish HDW interface. Its aim is to cover various types of diseases (*i.e.* new, exotic and endemic diseases) as well as several hosts (*i.e.* wild ungulates, wild birds and zoo animals). The work developed in this thesis consists of six papers published in journals of international impact and one in preparation, describing epidemiological models, diagnostic methods, immunological studies and experimental challenges, all of them preceded by an extensive literature review. These works have been summarised under the six objectives described below.

The study included in **objective 1** consisted in a **literature review** to recognise which wildlife species and which pathogens have attracted scientific interest over the past 25 years. After the depuration of the database, the search resulted in 4,428 scientific publications. The wildlife group most frequently represented was mammals, followed by fish and birds. A significant increase in the trend of publication was observed over the study period, with a very clear increase since 2009. This could be explained by the recent interest in the health of aquatic animals or the appearance of certain emerging pathogens, such as *Batrachochytrium dendrobatidis*, a species of fungus affecting amphibians. This review highlights the need to study infections in wildlife and their impact on wild populations, as well as in animal and public health.

The objectives 2 and 3 deal with two **vector-borne emerging diseases** of current and breaking relevance, namely West Nile fever (WNF) and Schmallenberg disease (SBD). In the **second objective**, a risk mapping of WNF in the Spanish Autonomous Community of Castile and León was performed. This disease is considered exotic in the region, but its incursion could lead to significant health impact on both equids and humans. In this sense, several layers were considered: equine density, abundance of wild birds and information on environmental and climatic variables with influence on the presence of the principal vector, *Culex pipiens* (*i.e.* presence of wetlands, temperature and rainfall). Different risk maps were obtained, one for the overall risk period (*i.e.* from April to October) and one for each month. As a result, the most suitable areas of the region were depicted, distributed throughout the provinces of Castile and León. In addition, the summer months were the ones at higher risk. Comparing these results with the areas of the current WNF surveillance programme and the areas of higher human population of the autonomous region, improvements in health activities against this disease in Castile and León were raised.

The **objective 3** focuses on SBD, a vector-borne viral disease which was described in late 2011 in the border region between Belgium, the Netherlands and Germany. This infection had a very rapid spread across Europe, affecting more than 4,000 ruminant farms in eight European countries, including Spain, in just six months. Several reasons have been proposed to explain the rapid spread of this virus, as the abundance of competent vectors or the involvement of other reservoirs such as wild ungulates. One of the major uncertainties ahead of predicting the potential spread of SBD and controlling future outbreaks is the level of natural immunity obtained by the animals after getting infected with the virus. For this reason, experimental challenges were performed on ewes from the only sheep farm with a SBD outbreak declared in Spain and in lambs born from these. The study concluded by demonstrating that sheep with antibodies against the Schmallenberg virus (SBV) offered resistance to experimental inoculation. Similarly, colostral antibodies transferred to the lambs seem sufficient to prevent the infection of these. These results have a very positive impact on disease control, and support the theory that animals that have been infected may serve as a barrier to the spread of VSB. However, further research should be performed to understand the role of wildlife in the SBV circulation and maintenance.

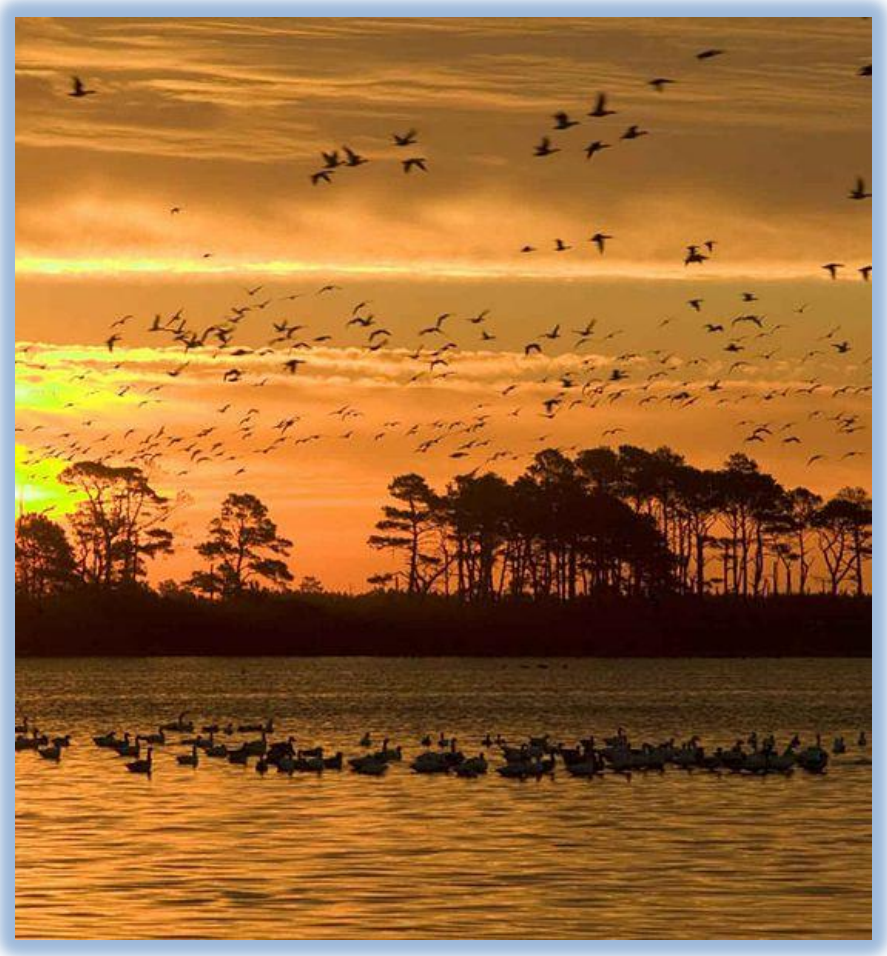
The objectives 4 and 5 deal with **endemic diseases of the central-southern region of Spain**. This region is characterized by a livestock production primarily raised in extensive conditions, as well as by an increase in the number of hunting estates to meet the high demand of hunting in the region. This implies that wildlife coexist with livestock in some areas. In these zones, the interaction between domestic and wild animals is quite common, enhancing pathogen transmission. *Mycobacterium bovis* is perhaps the best-studied pathogen in this regard, which has a fairly wide host range. Despite all efforts to eradicate it at a national level, it persists over time, even with an increasing incidence in some areas. In addition, other pathogens, not as ubiquitous and more specific, exist, whose study may help to understand the importance of interactions in the DW interface.

Therefore, in the **objective 4**, a Bayesian statistical model was performed to characterize the risk factors operating in the occurrence of bovine tuberculosis (BT) within the DW interface in the province of Ciudad Real. It was determined that the risk was concentrated in the southwestern part of the province. Several risk factors were highlighted in the model, such as those related to the occurrence of BT in cattle, sampling intensity in cattle, BT in wild reservoirs (*i.e.* red deer and wild boar), management of the hunting estates and the presence of cattle raised in extensive conditions (*i.e.* those devoted to meat production and bullfighting). Understanding how each of these factors operates is vital in order to control the infection and to propose realistic programs for the BT eradication.

As for the **objective 5**, the circulation of two viral diseases in the DW interface of Ciudad Real was studied by virological and serological techniques: the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) between wild boar and Iberian pigs and the bovine viral diarrhoea (BVD) between red deer, wild boar and extensively bred cattle. In light of the results, PRRS virus seems not to be a good marker of the interaction at the interface, and the role of wild boar as a reservoir of infection is discarded, due to the low seroprevalence obtained and the null detection of the virus by RT-PCR. Instead, the BVD virus seems to be more actively circulating among populations of red deer and cattle (but not in wild boar). This fact even suggests that the virus may be circulating independently in deer populations. Thus, BVD virus could serve as a health marker at the interface between domestic and wild ruminants.

Finally, in the **objective 6**, the use of **infrared thermography** for the study of wildlife and the diagnosis of pathologies that cause variations in surface temperature was raised. To this end, we studied five juveniles of Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*) kept in captivity as a model. After several sessions in order to adapt the technique and the animals, it was determined that the process of thermoregulation occurred through the development of thermal windows over the entire body surface, but mainly in the trunk, the hind flippers and the hips. In addition, it is important to consider the time of stabilization of thermal windows (*i.e.* from their first appearance to their complete development). This mechanism must be taken into account when diagnosing any disease through infrared thermography. However, this study highlights the potential of this technique for its use in wild animals, given its non-invasive nature and the wide range of applications it has for the diagnosis of both physiological and pathological processes.

The articles included in this thesis describe methods and results that are innovative in the field of infectious diseases and wildlife. They also serve as a model for other diseases, wild species or regions with similar epidemiological features. All the issues raised in this thesis can have direct application to surveillance and control of diseases in wild populations, especially those transmitted in the HDW interface, whose inclusion in comprehensive plans for health management is becoming increasingly paramount.



1. INTRODUCCIÓN

Fuente de la imagen: U.S. Fish and Wildlife Service, 2013 [dominio público]

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La fauna silvestre en España

1.1.1 La biodiversidad española

España es uno de los países europeos con mayor riqueza medioambiental y diversidad biológica (Álvarez-Uría Tejero y Zamorano Chico, 2007). La posición geográfica de la Península Ibérica, rodeada por los mares Mediterráneo y Cantábrico y el océano Atlántico, le otorga unas características climatológicas cuando menos peculiares y variadas. Asimismo, las diferencias de altitud y orografía permiten la coexistencia de gran variedad de biotopos, desde el clima desértico hasta bosques subtropicales. Estas circunstancias favorecen el hecho de que la biodiversidad de especies en España sea mayor que la de países vecinos (de la Fuente López y Rodríguez Vigal, 2007). En concreto, la Península Ibérica cuenta con aproximadamente 870 especies de animales vertebrados continentales (Tabla 1), lo que supone casi la mitad de todas las especies descritas en la cuenca mediterránea. Además, cabe señalar que muchas de estas especies son endémicas del territorio nacional (Tabla 1), algunas estando seriamente amenazadas (Madroño *et al.*, 2004; Blanco, 2007).

Tabla 1. Número de especies y porcentaje de endemismos de la fauna silvestre española [Fuente: adaptación de Lizana y Viejo, 2007].

	Nº especies	% endemismos
Vertebrados continentales	**870**	**10,5**
Mamíferos	158	13,2
Aves	521	2,6
Reptiles	87	11,5
Anfibios	35	32
Peces continentales	69	50-55

Asimismo, a lo largo de la historia se han introducido en España especies de otras regiones que han conseguido adaptarse perfectamente a las condiciones de nuestro país. El hombre ha estado normalmente involucrado en la introducción de estas **especies alóctonas**, ya sea con fines cinegéticos (como el muflón o el arruí), peleteros (como el visón americano o el coipú) o por descuido en el confinamiento de animales en cautividad (como la ardilla moruna) (Blanco, 2007).

1.1.2 Principales especies de animales silvestres de España

Históricamente ha existido cierto grado de polémica para acordar una definición de "**fauna silvestre**". Tras un largo debate, el grupo de trabajo de la OIE especialista en enfermedades de fauna silvestre, junto con el grupo *ad hoc* de epidemiología acordaron los términos incluidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Definiciones relacionadas con la fauna silvestre [Fuente: adaptación de OIE, 1999].

		Fenotipo seleccionado por el hombre	
		Sí	**No**
Animales bajo supervisión y control humanos	**Sí**	Animal doméstico (*Domestic animal*)	**Animal silvestre cautivo** (*Captive wild animal*)
	No	**Animal asilvestrado o cimarrón** (*Feral animal*)	**Animal silvestre p.d.** (*Wild animal*)

Así pues, se podría considerar "fauna silvestre" (*wildlife*) al conjunto de los animales silvestres (*i.e.* tanto cautivos como en libertad) y los animales asilvestrados.

De la variedad de especies de **mamíferos silvestres** existentes en España, la lista podría reducirse a unas 28 relevantes desde un punto de vista sanitario (RASVE, 2013) (Figura 1). En concreto, las **especies cinegéticas** tienen una mayor relevancia por su abundancia, proximidad filogenética al ganado y accesibilidad para la toma de muestras durante los eventos de caza.

En este sentido, los **ungulados** representan uno de los grupos más importantes. En España existen ocho especies de interés. El jabalí (*Sus scrofa*) es el único representante de los suidos. Se puede considerar como el ungulado más extendido y abundante de Europa (Apollonio *et al.*, 2010). Recientemente se han realizado diversos modelos para caracterizar su distribución y densidad en España (Bosch *et al.*, 2012; Acevedo *et al.*, 2014). A su vez, las tres especies de cérvidos, ciervo o venado (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) se encuentran ampliamente distribuidas y en expansión, llegando a densidades de 10 individuos/km^2 (RASVE, 2013). La importancia de estas especies las convierte en objeto principal de esta tesis doctoral.

Respecto a los bóvidos silvestres (RASVE, 2013), solo existen dos especies autóctonas, el rebeco (*Rupicapra pyrenaica*) y la cabra montés (*Capra pyrenaica*) no tan abundantes como los cérvidos. Además, se incluyen una especie doméstica asilvestrada, la cabra cimarrona (*Capra hircus*) y dos especies alóctonas con fines cinegéticos, el muflón (*Ovis aries*) y el arruí (*Ammotragus lervia*).

Figura 1. Mamíferos ibéricos silvestres de interés sanitario. En la derecha quedan representados los ungulados: bóvidos (en rojo), cérvidos (en amarillo) y el jabalí como único representante de los suidos silvestres (en naranja). Además, se muestran los lagomorfos (en verde) y una representación de los carnívoros (en azul). [Fuente de las imágenes: Wikipedia].

El grupo de los **carnívoros** está bastante representado en España, con 16 especies. La posición que ocupan en las cadenas tróficas les hace buenos indicadores para la monitorización de enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los carnívoros son especies protegidas, por lo que no se puede acceder a muestras con tanta facilidad. En este sentido, el zorro (*Vulpes vulpes*) no presenta este problema, ya que es una especie abundante, se encuentra muy extendido por la geografía española y tiene un comportamiento antropófilo.

En cuanto a los **lagomorfos**, en España se encuentran cuatro especies, tres de liebres y el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Tradicionalmente estas especies estaban muy distribuidas por nuestro país; de hecho, el nombre de España viene del fenicio *i-spn-ya*, "tierra abundante en conejos". Sin embargo, en las últimas décadas las poblaciones se han visto mermadas (p.ej. Villafuerte y Delibes-Mateos, 2007) lo que conlleva una grave amenaza ecológica (Virgós *et al.*, 2007), sobre todo por su valor como presas de especies emblemáticas, como el lince ibérico (*Lynx pardinus*) y el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).

Además, en España existe un total de 30 especies de **quirópteros** (CSIC, 2014). Aunque no estén contemplados en este manual, un conjunto de características ecológicas, biológicas, inmunológicas y genéticas únicas hacen de los murciélagos un reservorio animal favorable para la aparición de nuevos patógenos (Chan *et al.*, 2013).

Por otro lado, la **avifauna española** puede considerarse una de las más ricas e interesantes de Europa (Lizana y Viejo, 2007) con cerca de 521 especies descritas. Así, este grupo de vertebrados se considera el más numeroso por detrás de los peces marinos. Muchas de estas especies utilizan el territorio nacional como lugar de paso entre sus áreas de cría norteñas y sus zonas de invernada tanto mediterráneas como del sur del Sahara, o entre sus lugares de reproducción en el Mediterráneo y de reposo en el Atlántico. Como endemismos ibéricos, se podría citar el águila imperial ibérica o el mosquitero común (*Phylloscopus brehmii*), cuyas zonas de cría quedan prácticamente limitadas a las fronteras nacionales (Lizana y Viejo, 2007).

1.1.3 Biorregiones de España: reflejo de la biodiversidad

Como se ha visto anteriormente, España es un país muy rico en cuanto a ecosistemas y a animales que los conforman. Sin embargo, de cara a plantear medidas de gestión del medio natural, surge la necesidad de caracterizar esta diversidad de especies, ambientes y climas. Por ello, se ha clasificado la superficie española en seis **biorregiones (BRs)** (Figura 2) atendiendo a características faunísticas, ambientales y climatológicas (Muñoz *et al.*, 2010; RASVE, 2013). De esta forma, las distintas unidades territoriales del país (Anexo 1) quedan agrupadas de manera que se puedan comparar y simplifican la planificación de actividades de gestión.

Código	NUTS de España que ocupan
BR1	ES1, ES212, 213
BR2	ES211, ES22, ES23, ES241, ES243, ES412, ES413, ES414, ES416, ES418, ES419, ES513
BR3	ES411, ES415, ES422, ES425, ES43, ES613, ES616, ES618
BR4	ES242, ES3, ES417, ES421, ES423, ES424
BR5	ES511, ES512, ES514, ES52, ES53, ES611, ES612, ES614, ES615, ES617, ES62, ES63, ES64
BR6	ES7

Figura 2. Mapa de las biorregiones de España [Fuente: adaptación de RASVE, 2013]

En la Tabla 3 se pueden observar las principales diferencias de las BRs en cuanto a **densidad de animales silvestres** de los principales taxones de interés sanitario y a su **manejo antropogénico**. En este sentido destaca la **BR3**, objeto de esta tesis doctoral, por el frecuente manejo de la fauna silvestre con fines cinegéticos. También se indica la presencia de **humedales**, los cuales revisten una importancia radical como punto de congregación de aves, principalmente durante las migraciones.

Tabla 3. Características de las biorregiones de España [Fuente: adaptación de RASVE, 2013]

			Densidad de animales silvestres				
BIORREGIÓN		**Manejo artificial de la fauna silvestre**	**Ungulados**	**Carnív.**	**Lagom.**	**Gallif.**	**Humedales**
BR1	**España atlántica**	No	**Localmente alta**	**Relat. alta**	Baja	Baja	Humedales atlánticos
BR2	**Llanuras cerealistas**	Escaso	Jabalí y corzo: **en expansión**	Descon.	**Alta**	**Alta**	Villafáfila y otros
BR3	**Ecosistemas mediterráneos continentales**	**Frecuente** Fuerte interacción con ganadería extensiva	Jabalí y ciervo: **media-alta**	Descon.	**Alta**	**Alta**	Ciudad Real, Badajoz y Jaen
BR4	**Montañas interiores**	Escaso	Moderada	Descon.	Baja	Baja	Albacete, Cuenca y Teruel
BR5	**Costa sur y oriental**	Escaso	Jabalí y cabra montés: **localmente alta**	Baja	**Alta**	Descon.	Humedales muy relevantes
BR6	**Islas Canarias**	Desconocido	Baja	Baja	**Localm. alta**	Descon.	Saladar de Jandía

1.1.4 Determinantes ecológicos en el cambio del panorama silvestre en la actualidad

La **ecología** puede definirse como la ciencia que estudia las interacciones de los organismos entre sí y con el entorno en el que viven. El estudio de la ecología de las especies silvestres resulta imprescindible a la hora de hacer una valoración integral del estatus sanitario de las poblaciones (Delahay *et al.*, 2009).

Desde una perspectiva ecológica, se entiende que la elevada biodiversidad de España está ligada en parte a la gran variedad de usos tradicionales del territorio, particularmente los asociados a los sistemas agrarios y forestales (Álvarez-Uría Tejero y Zamorano Chico, 2007). De ahí surge precisamente la necesidad de gestionar los entornos agroculturales junto con el medio natural y la fauna silvestre.

España se caracteriza, entre otras, por una notable extensión de bienes comunales, siendo la mayoría espacios seminaturales en los que habita gran parte de la fauna autóctona del país. Por esta razón el **abandono rural** y el cese de la actividad humana que mantiene estos espacios tienen un fuerte impacto en los ecosistemas (Álvarez-Uría Tejero y Zamorano Chico, 2007). De hecho, mientras que la población total de España se ha visto incrementada en un 24% en los últimos 30 años, la población de municipios pequeños (*i.e.* menos de 10.000 habitantes) se ha reducido del 27,12 al 21,04% (elaboración propia con datos del INE, 2014). A su vez, esto ha impulsado el **desarrollo urbano** e importantes **cambios en el uso del suelo** en aras de adaptar el medio a esta evolución de la estructura demográfica del país. Asimismo, se ha tenido que **intensificar la producción ganadera** para satisfacer la demanda de proteína animal, sinónimo de bienestar económico. Estos hechos acarrean efectos indeseables sobre el medioambiente (Daszak *et al.*, 2000; Daszak *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2009) que se reflejan, por ejemplo, en la **fragmentación, destrucción o pérdida de hábitats naturales** o en un aumento de la **contaminación ambiental** (ya sea química, acústica o lumínica).

Otro de los aspectos que puede tener una importante repercusión sobre el equilibrio de los ecosistemas es la **competencia interespecífica**, ya sea por **causas naturales** (p.ej. alteración de la relación depredador-presa, competencia por recursos) o por la **introducción de especies por el hombre** (p.ej. comercio de animales exóticos, translocaciones de individuos para alcanzar las densidades deseadas).

A su vez, en España existe una fuerte **tradición cinegética** (Herruzo y Martinez-Jauregui, 2013) sobre todo en la región centro-sur del país (*i.e.* BR3) y supone, al igual que en Europa, un fuerte motor económico (Chomel *et al.*, 2007). Según datos de la Real Federación Española de Caza, se han generado en la temporada 2010-2011 aproximadamente 3.600 millones de euros y unos 54.000 puestos de trabajo (Garrido, 2012). El jabalí y el ciervo son las dos especies de caza mayor más emblemáticas (Garrido, 2012) suponiendo entre ambos casi un 90% de los 3.197.835 animales abatidos en las temporadas de caza de 2001 a 2011. En este periodo se ha observado que la caza mayor ha experimentado un notable incremento, haciendo que España ocupe el primer puesto europeo en cuanto a la caza de ciervo y el tercero en cuanto a la de jabalí (Apollonio *et al.*, 2010). En cambio, el sector de la caza menor ha sido mucho más fluctuante, siendo el conejo y la perdiz las especies más cazadas (Garrido, 2012). Particularmente en la región centro-sur, el reclamo de las actividades de caza ha fomentado que muchas explotaciones ganaderas se hayan convertido en cotos cinegéticos (Delibes-Mateos *et al.*, 2009; Kukielka *et al.*, 2013). Si bien estas actividades pueden fomentar la protección del entorno natural y el acceso a muestras de ciertas especies, la caza ha generado en los últimos años un sentimiento muy negativo en la opinión pública (Fischer *et al.*, 2013), apelando a la falta de necesidad de este tipo de actividades y la falta de control sobre tenencias de cotos y gestión de las especies en los mismos.

A su vez, dentro de esta corriente "verde", en los últimos años se ha observado un aumento de las actividades recreativas en la naturaleza encuadradas en el denominado "**ecoturismo**" (Turespaña, 2014). La creciente oferta de actividades incluye excursiones de senderismo, sendas fotográficas y actividades deportivas. Aunque estas actividades promulgan la protección del medioambiente, pueden suponer alteraciones del comportamiento de los animales silvestres, así como la generación de residuos (Liddle, 1997). Por ello, las empresas encargadas deberían reforzar la concienciación de los "ecoturistas" para hacer que su actividad tenga el mínimo impacto posible (Liddle, 1997).

Todos los ejemplos anteriormente descritos resaltan la aparición de nuevos patrones socioculturales propios del siglo XXI. Estos cambios, fruto de la pretensión del ser humano por mejorar la calidad de vida, pueden conllevar la alteración del medio natural, acarreando problemas de otra índole, incluso sanitarios.

1.2 Fauna silvestre y enfermedades infecciosas

1.2.1 El auge de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre

Los agentes patógenos juegan un papel muy importante en la ecología y en el entorno natural, ya que de algún modo regulan las poblaciones silvestres mediante el efecto de presión selectiva en el proceso de evolución (Sommer, 2005). De hecho, la pérdida de ciertos microorganismos puede llegar a ser perjudicial para el mantenimiento de un correcto funcionamiento de los ecosistemas (IUCN-OIE, 2014).

Sin embargo, en las últimas décadas, todos los cambios ecológicos anteriormente citados, sobre todo los antropogénicos, han alterado la manera en la que las enfermedades afectan no solo a los animales silvestres, sino a los ecosistemas en su conjunto (Yale *et al.*, 2013). Por ello, el estudio de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre demanda la consideración de muchos factores biológicos, ecológicos, políticos y socioeconómicos para poder comprender el impacto que suponen para la conservación de la biodiversidad, la sanidad animal, el comercio internacional y la salud pública.

Esta necesidad ha impulsado la creación de grupos científicos multidisciplinares que incluyen, entre otros, ecólogos, ingenieros forestales, veterinarios y epidemiólogos (Gortázar *et al.*, 2007). De hecho, a la hora de plantear esta tesis doctoral, se puso de manifiesto el enorme interés científico por las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre. Esta nueva tendencia ya se había apreciado con anterioridad, plasmada en un incremento en el número de publicaciones científicas relacionadas con este tema, sobre todo desde 2000 (Gortázar *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2013). Sin embargo, no fue posible encontrar ningún artículo que centrara cuáles son las enfermedades y las especies silvestres más relevantes en este sentido.

Por ello, se planteó como uno de los objetivos de esta tesis conocer cuáles son los patógenos y las especies silvestres que han motivado esta evolución. Del mismo modo, se quisieron revisar los aspectos más relevantes de las enfermedades de la fauna silvestre y de su gestión sanitaria, los cuales se desarrollarán a lo largo de esta introducción.

1.2.2 Conceptos relevantes sobre las enfermedades infecciosas

En el contexto de las enfermedades infecciosas, son muchos los factores que van a intervenir para decidir si un patógeno es o no capaz de causar infección de un hospedador. Esta naturaleza multifactorial de las enfermedades viene dada por la presencia previa o no del patógeno en la región de interés, el patrón temporal con el que se activa, el tipo de hospedadores a los que puede infectar y cómo se puede transmitir entre estos. Según esto, las enfermedades se pueden clasificar atendiendo a diferentes características:

A) **Según el patrón de ocurrencia de enfermedad**[1]:

- Enfermedad endémica: aquella que afecta a una región de forma permanente o estacional regular a lo largo de varios años.
- Enfermedad esporádica: aquella que ocurre intermitentemente siguiendo un patrón irregular.
- Enfermedad nueva[2]: aquella previamente desconocida o no definida, aunque pueda tener su origen en algún microorganismo existente que haya evolucionado, ocasionando un cambio de cepa, rango de hospedador, vector, patología y/o incremento de la virulencia.
- Enfermedad exótica[2]: aquella que, conociéndose el agente patógeno causal, cruza fronteras políticas para afectar un país o región en el cual no se había registrado la enfermedad con anterioridad.
- Enfermedad reemergente[2]: aquella que, conociéndose el agente patógeno causal, no está presente o lo está a un nivel muy bajo en una población de un área geográfica concreta y reaparece o aumenta significativamente su virulencia. Asimismo, se podrían incluir en esta categoría aquellas enfermedades vectoriales nuevas o exóticas que ocurren de nuevo en las temporadas de infección siguientes a su primera introducción en una región.

[1] Respecto al patrón de ocurrencia, se ha elegido esta clasificación ya que es la más completa de las consideradas a la hora de redactar la tesis. Para ello, se han consultado varias referencias bibliográficas de impacto (Woolhouse, 2002; King, 2005; OIE, 2011; Hoinville *et al.*, 2013).

[2] Con motivo de simplificar la terminología utilizada en el presente manuscrito, se citarán a partir de aquí como "**enfermedades emergentes**" las enfermedades nuevas, exóticas y reemergentes.

B) **Según las vías de transmisión potenciales** (Bengis *et al.*, 2002; Hudson, 2002; OIE, 2010):

- Enfermedad de transmisión directa: aquella que se transmite directamente de animal a animal por contacto estrecho entre ambos. Las vías principales suelen ser el contacto piel-piel, los aerosoles, las secreciones y excreciones o la transmisión venérea.
- Enfermedad por contaminación ambiental: aquella en la que intervienen fuentes indirectas de contaminación, siendo las más comunes el aire, el agua, el alimento, los vehículos de transporte y los fómites.
- Enfermedad vectorial: aquella cuya transmisión desde un hospedador infectado a otro libre de enfermedad se realiza a través de un organismo intermediario o vector, en el cual se suele dar alguna de las fases reproductivas del agente patógeno o, al menos, una multiplicación del mismo previo al contagio. Los vectores más relevantes son los artrópodos, destacando los mosquitos, las garrapatas y los jejenes del género *Culicoides*. Hay muchas enfermedades en las que la vía vectorial supone tan solo una vía más de transmisión, considerándose como vector mecánico. Por el contrario, hay otras que requieren la actuación de los vectores para poder transmitirse (*i.e.* vector biológico), consideradas como enfermedades de carácter vectorial obligado.

C) **Según el rango de hospedadores**:

- Enfermedad específica: aquellas que afectan a una especie animal en concreto.
- Enfermedad común a varias especies: aquellas que afectan a un rango más o menos amplio de hospedadores. Así pues, dependiendo del tipo de patógeno, podrán afectarse especies tan solo de un mismo taxón o tener un carácter mucho más generalista. Los agentes patógenos relacionados con estas enfermedades son los que tienen más posibilidades de cambiar, por lo que suelen ser responsables de brotes emergentes (Woolhouse, 2002).
- Zoonosis: aquellas que se pueden transmitir de los animales al hombre.
- Antroponosis: aquellas que se pueden transmitir del hombre a los animales

1.2.3 Conceptos relevantes sobre los papeles epidemiológicos

Como se ha citado anteriormente, son varios los "actores" que intervienen en el ciclo epidemiológico de las enfermedades infecciosas, así como variados los papeles que pueden jugar según cada enfermedad. Así pues, los hospedadores podrían dividirse según la siguiente clasificación (Martin *et al.*, 2011b):

- **Reservorio u hospedador de mantenimiento (*reservoir, maintenance host*)**: especie capaz de mantener una infección en un área determinada, en ausencia de contaminación cruzada de otros animales domésticos o silvestres. Para poder considerar una población como reservorio de una infección, su número básico de reproducción (R_0) debe ser mayor que 1 (Haydon *et al.*, 2002). A su vez, los animales reservorio pueden dividirse en varias categorías, según la población diana:
  - Reservorio principal o verdadero: la especie es capaz de mantener la infección por sí misma.
  - Reservorio accesorio: mantiene la infección de manera secundaria al reservorio principal.
  - Reservorio oportunista: especie capaz de infectarse accidentalmente, pero sin sufrir serias consecuencias.
  - Reservorio potencial: especie que podría llegar a infectarse debido a razones biológicas o ecológicas, pero que no se ha podido identificar hasta la fecha como tal bajo condiciones naturales.
- **Hospedador por derramamiento (*spillover host*)**: especie capaz de mantener la infección tras contactos recurrentes con una fuente externa de patógenos. Es decir, para que persista la infección en este tipo de hospedadores, se requiere de una fuente de reinfección por parte de otras especies. A su vez, un hospedador *spillover* podría convertirse en reservorio si el patógeno es capaz de adaptarse y circular de manera activa en la población.
- **Hospedador fondo de saco epidemiológico (*dead-end host*)**: especie capaz de infectarse con el agente patógeno, pero incapaz de transmitirlo en condiciones naturales. En ellos se detiene el ciclo epidemiológico.

- **Hospedador portador asintomático (*asymptomatic carrier*)**: especie capaz de infectarse y excretar el patógeno sin desarrollar signos clínicos evidentes.

Aunque estas definiciones sean bastante claras, en ocasiones resulta difícil asignar el papel epidemiológico a cada una de las especies potencialmente implicadas (Haydon *et al.*, 2002). De hecho, según Martin *et al.* (2011b) de los trabajos que describen infecciones en especies silvestres, solo en el 34,2% los autores sugieren el papel de estas en el ciclo epidemiológico. Esto se debe al desconocimiento que existe sobre el estatus sanitario de la fauna doméstica y/o silvestre ante determinadas infecciones, así como sobre las interacciones entre especies (Martin *et al.*, 2011a).

1.2.4 "Citas célebres" sobre la fauna silvestre y su implicación en las enfermedades infecciosas

Cuando se plantea una revisión científica sobre el papel de los animales silvestres en las enfermedades infecciosas, es frecuente encontrarse con las mismas frases acerca de la importancia de los mismos, sobre todo en aquellas publicaciones relativas a patógenos emergentes zoonósicos. Sin embargo, pese a la recurrencia de estas frases, en ocasiones resulta difícil encontrar la fuente original. A continuación se indican las citas más clásicas respecto a este tema:

- El 77% de los agentes patógenos para el ganado y el 90% de los patógenos para carnívoros domésticos pueden infectar múltiples hospedadores, incluida la fauna silvestre (Cleaveland *et al.*, 2001).
- El 75% de los patógenos que amenazan a la fauna silvestre se transmiten por contacto directo (Pedersen *et al.*, 2007).
- De todos los patógenos que pueden infectar al hombre, el 58-61% son agentes zoonósicos (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005).
- De los patógenos emergentes, el 73-75% son zoonósicos (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005), aunque un estudio más reciente indica que la proporción es del 60% (Jones *et al.*, 2008).
- Asimismo, el 75% de estos patógenos zoonósicos emergentes tienen su principal origen en la fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008).

1.2.5 Factores ecológicos de las enfermedades compartidas

Si bien la definición de ecología puede ser amplia, se puede definir la **ecología de las enfermedades** como la rama de la ecología que estudia las interacciones entre los patógenos, los animales a los que infectan y el entorno que comparten (Snieszko, 1973). Por lo tanto, esta ciencia implica un enfoque multidisciplinar que integra factores genéticos, biológicos, sociales, económicos, políticos, ecológicos y medioambientales, así como sus complejas interacciones (Hudson, 2002; Wilcox y Gubler, 2005).

Uno de los aspectos que más se han desarrollado en los últimos años es el concepto de interrelación entre humanos, ganado doméstico, fauna silvestre y el medioambiente que les rodea. Este concepto emergente, de alta relevancia para esta tesis doctoral, se ha pasado a denominar **interfaz humanos-animales domésticos-fauna silvestre** (**interfaz HDS**). Entre todos estos componentes se crea, por tanto, una red de conexiones dinámicas que permite el intercambio de patógenos en todas las direcciones (Figura 3). De hecho, es precisamente en estos escenarios en los que aumenta la probabilidad de emergencia de nuevos patógenos (Rhyan y Spraker, 2007), ya que se incrementan las oportunidades para que los patógenos evolucionen (Siembieda *et al.*, 2011). Así pues, las enfermedades desarrolladas en la interfaz HDS han adquirido en los últimos años una importancia vital.

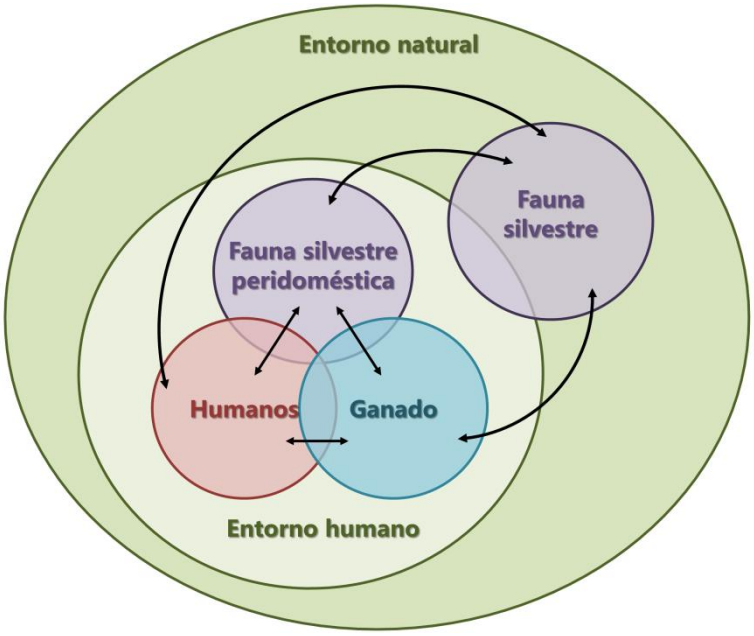


Figura 3. Diagrama de flujo de patógenos en la interfaz humanos-animales domésticos-fauna silvestre (Fuente: adaptación de Jones *et al.*, 2013).

En concreto, las enfermedades de declaración obligatoria, las erradicadas y las prácticamente controladas en los animales domésticos son las que más preocupan en estas situaciones de interacción (Gortázar *et al.*, 2007) ya que un simple contacto efectivo con un animal silvestre infectado puede tener graves consecuencias sanitarias y económicas.

Es importante considerar el efecto perjudicial de las enfermedades infecciosas en todos sus hospedadores. Históricamente, las enfermedades de la fauna silvestre han tenido importancia cuando estas amenazaban a la ganadería y/o a la salud pública (Daszak *et al.*, 2000). De hecho, en multitud de ocasiones se ha culpado a los animales silvestres de ser la fuente de patógenos para humanos y ganado doméstico (Fischer y Gerhold, 2002; Anónimo, 2004). Sin embargo, pese a lo que se ha venido pensando tradicionalmente, la **transmisión de patógenos entre animales domésticos y silvestres suele ser multidireccional** (Bengis *et al.*, 2002). De hecho, son muchos los ejemplos de introducción de patógenos desde el ganado al mundo silvestre. La tuberculosis bovina (TB) es quizá el ejemplo mejor estudiado (p.ej. Palmer *et al.*, 2012), aunque en otras enfermedades como la sarna sarcóptica (Smith *et al.*, 2009), la infección por el parvovirus canino tipo 1 (Daszak *et al.*, 2000) o la queratoconjuntivitis infecciosa (Giacometti *et al.*, 2000) se ha demostrado que la transmisión se ha originado en los animales domésticos. Además, cada vez hay más evidencias de transmisión de patógenos desde los humanos a animales, lo que se conoce como "**zooantroponosis**" o "**zoonosis inversa**" (Messenger *et al.*, 2014). No hay que olvidar que en ocasiones este sesgo hacia los animales silvestres puede provocar acciones drásticas con un potencial efecto devastador sobre los esfuerzos de conservación (Brook y McLachlan, 2006). Así pues, el estudio de la dinámica y el flujo de patógenos (**direccionalidad de la transmisión**) resulta clave de cara a predecir y controlar futuras incursiones de patógenos. En definitiva, conocer "quién infecta a quién".

De entrada, uno de los temas que despierta gran interés es el estudio de la **transmisión intra e interespecífica de patógenos**, de cara a conocer el estatus de hospedador que ocupa cada una de las especies implicadas en la circulación de la enfermedad (Caley y Hone, 2004). De hecho, resulta vital para poder valorar la eficacia de ciertas medidas de control de enfermedades en fauna silvestre (p.ej. vacunación,

reducción de densidad de población, etc.). La TB ha sido una enfermedad utilizada frecuentemente en este tipo de estudios, ya que se dispone de mucha información en cuanto a los reservorios silvestres y, además, su erradicación se considera prioritaria en todo el mundo (McInerney *et al.*, 1995; O'Mairtin *et al.*, 1998; Caley *et al.*, 1999; Gortazar *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 2012; Walter *et al.*, 2012).

Otro de los hechos claves a la hora de entender la circulación de patógenos en sistemas multihospedador es precisamente la variedad de **vías de transmisión** (Jones *et al.*, 2011). De manera general, las rutas de transmisión que determinan la circulación de patógenos están influidas por factores intrínsecos y extrínsecos al patógeno. Los **factores intrínsecos** (p.ej. especificidad de hospedador, características de resistencia en el medio o capacidad de replicación) van a determinar la capacidad del patógeno para persistir en el tiempo en una o varias especies distintas. Asimismo, los **factores extrínsecos** hacen relación a las limitaciones espaciotemporales de las potenciales vías de transmisión. Es decir, se refiere a aquellos factores ecológicos, etológicos y de manejo que determinan que el contacto entre dos especies sea efectivo para la transmisión del patógeno. Así pues, los patógenos transmitidos por vía indirecta tendrán mayores posibilidades de éxito, ya que no requieren estrictas condiciones espaciotemporales. Aun así, la caracterización de la estructura de contactos espaciotemporales entre especies permite identificar cuáles serán las mayores amenazas sanitarias (Pruvot *et al.*, 2014).

Además, hay otros factores ecológicos que influyen en la regulación de las poblaciones silvestres y modulan la manera en la que los patógenos pueden transmitirse, muchos de ellos de carácter antropogénico (Gortázar *et al.*, 2000). Por ejemplo, la **sobreabundancia de especies** puede jugar un papel importante en el estatus sanitario de las poblaciones silvestres. Si bien existen mecanismos naturales que regulan la densidad de animales silvestres, las situaciones provocadas por la acción del hombre son las que entrañan un mayor riesgo, especialmente en especies de valor cinegético. Existen evidencias de los efectos de la abundancia de hospedadores sobre la condición de los mismos, la agregación de individuos, la tasa de transmisión de patógenos, el riesgo de infección, la exposición a múltiples agentes infecciosos y, en definitiva, el estatus sanitario de la fauna silvestre (Gortázar *et al.*, 2006).

Por otro lado, en los últimos años ha habido una demanda tanto política como de parte de los consumidores de una producción animal bajo estrictas regulaciones de bienestar animal y "más respetuosa con el medioambiente" (Martin *et al.*, 2011b). De hecho, en España, la superficie agrícola orgánica se ha incrementado en casi un 300% de 2004 a 2011 (elaboración propia con datos de FAOSTAT, 2014). En la línea de esta tendencia, se está fomentando el **desarrollo de explotaciones de carácter más extensivo**, lo que supone una reducción del confinamiento de los animales y, en definitiva, aumenta su exposición a los agentes patógenos (Gortázar *et al.*, 2007). Asimismo, la **práctica cinegética** es cada vez más extendida, lo que requiere de un manejo de las poblaciones silvestres cada vez más intensivo. Esto se traduce en vallado de cotos cinegéticos, suplementación de agua y alimentos o translocaciones. En definitiva, estas prácticas se podrían acercar a las realizadas con el ganado extensivo; sin embargo, los cuidados sanitarios son bastante más deficitarios (Gortázar *et al.*, 2007).

Las últimas décadas han estado caracterizadas por un incremento sin precedentes de la **movilización de humanos, animales, alimentos y productos**. Esta tendencia ha creado una red de conexiones internacionales que facilita tanto a patógenos como a vectores su difusión por la geografía mundial en breves periodos de tiempo (Daszak *et al.*, 2001). En cuanto a los animales, tanto el transporte asociado al comercio como los movimientos migratorios ocasionan agregaciones de individuos en un estado fisiológico de estrés, lo que tiene un claro impacto en el sistema inmune (Cutler *et al.*, 2010). La supresión inmunitaria puede conllevar la activación de infecciones latentes y aumentar la excreción/secreción de patógenos, por lo que aumenta notablemente la posibilidad de infección de cualquier animal susceptible. Estos hechos han sido ampliamente estudiados en el caso de la **gripe aviar** (Moutou, 2007), cuya difusión se ha visto especialmente asociada a las migraciones de aves silvestres, fundamentalmente las anátidas (Gilbert *et al.*, 2006).

El mantenimiento de animales amenazados en **zoológicos o reservas naturales** también pueden suponer un riesgo (Daszak *et al.*, 2000). En estos espacios se produce una congregación de especies alopátricas cuyo contacto en la naturaleza resultaría geográficamente imposible, lo que podría conllevar infecciones igualmente atípicas.

Este es el caso de la infección producida por el **herpesvirus endoteliotrópico de los elefantes**, cuya infección en los elefantes africanos (*Loxodonta africana*) pasa generalmente desapercibida, mientras que puede resultar fatal en su pariente asiático (*Elephas maximus*) (Richman *et al.*, 1999). Este virus está ocasionando serios problemas de conservación en zoológicos de Europa y Estados Unidos (van den Doel *et al.*, en revisión).

Aun así, el mantenimiento de especies en zoológicos tiene claras ventajas de cara a poder **estudiar con mayor facilidad especies silvestres en un ambiente controlado**, lo que ofrece una información que sería muy costosa de obtener de otra manera y facilita las intervenciones en el medio natural, siempre que se haga en condiciones de bienestar para los animales (Maple, 2007).

Por último, aunque en Europa, por el momento, el **cambio climático** no está teniendo repercusiones tan graves como en otras regiones del mundo, sí que se está observando una variación en los ciclos epidemiológicos de las enfermedades infecciosas, sobre todo en las **enfermedades vectoriales** (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, en revisión). Un ejemplo de actualidad es la enfermedad de Schmallenberg (ESB) (Hoffmann *et al.*, 2012). El agente patógeno de esta enfermedad nueva, el virus de Schmallenberg (VSB), pertenece al serogrupo Simbu de la familia *Orthobunyaviridae*, cuyos integrantes han circulado tradicionalmente por regiones tropicales (EFSA, 2014). El VSB, como otros orthobunyavirus, se transmite por jejenes de género *Culicoides*, muy conocidos en Europa por su implicación en la transmisión del virus de la lengua azul (VLA) (Carpenter *et al.*, 2009). La expansión geográfica de los jejenes en las últimas décadas (Jiménez-Clavero, 2012), junto con unas temperaturas más elevadas de lo habitual en el verano de 2011, ayudaron a la rápida difusión del virus, afectando casi 4.000 explotaciones de ocho países europeos en 6 meses, y llegando a España en 4 meses, proceso para el que el serotipo 8 del VLA (VLA-8) tardó 17 meses (Figura 4). Esto creó una alarma internacional que puso de manifiesto la vulnerabilidad de Europa frente a este tipo de enfermedades y conllevó importantes restricciones comerciales (CE, 2013). A su vez, se han detectado anticuerpos frente al VSB en 12 especies silvestres y 19 de zoológico (EFSA, 2014). Sin embargo, no se ha podido evidenciar el papel de estos como reservorio, lo que resulta vital de cara a la difusión y al control de la infección.

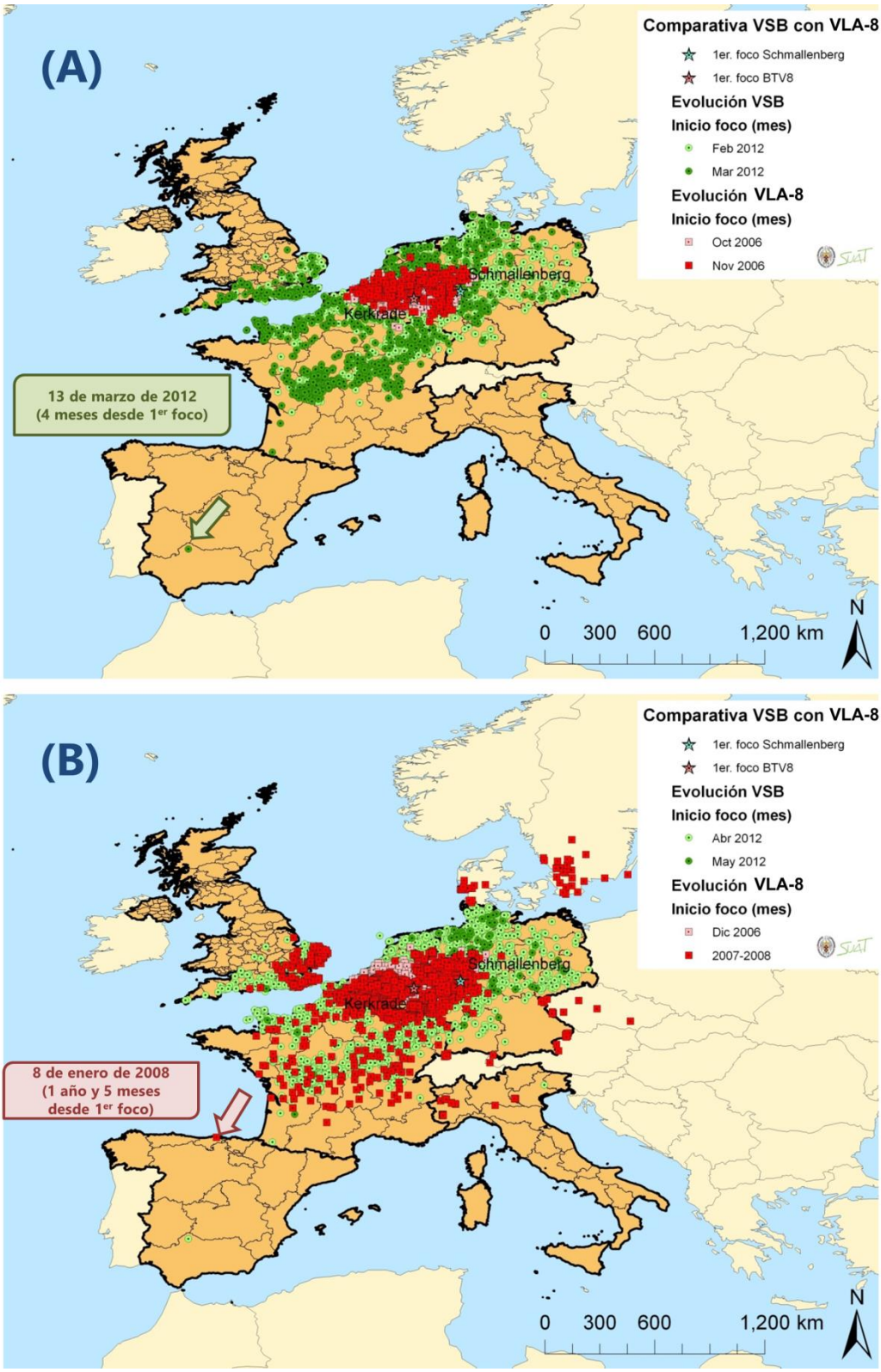


Figura 4. Comparativa de la difusión tras el primer brote del virus de Schmallenberg (VSB) y el primer brote de serotipo 8 del virus de la lengua azul (VLA-8) en Europa. Los brotes del VSB se representan en verde, mientras que los del VLA-8 se representan en rojo. Los cuadros de texto de las imágenes indican la fecha de la primera notificación en España de brote del VSB (Figura 4A) y del VLA-8 (Figura 4B) [Fuente: elaboración propia con datos de WAHIS-OIE; última actualización: 8 de junio de 2012].

1.3 Programas sanitarios para las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre

1.3.1 Importancia de la sanidad animal

La **sanidad animal** es una materia de vital importancia para el sostenimiento del mundo actual. La implantación de planes sanitarios adecuados tiene una repercusión directa en diversos ámbitos (Martínez-López *et al.*, 2013a):

- Garantiza el **estatus sanitario** óptimo de los animales de abasto y promueve su producción en términos de **bienestar animal**.
- Permite mantener la seguridad en los **movimientos comerciales de animales y productos ganaderos**, ya sea a nivel regional, nacional o internacional.
- Sostiene la **producción de alimentos seguros, sanos y de alta calidad**, enmarcada en la filosofía europea de trazabilidad y seguridad alimentaria *from farm to fork* ("de la granja a la mesa").
- Gracias a la consecución de los tres puntos anteriores, permite garantizar la **salud pública**, tanto por la prevención de las **zoonosis** como a través de la **seguridad alimentaria** y prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos.
- Indirectamente promueve la **sostenibilidad** y la **competitividad** del sector ganadero en un mercado cada vez más globalizado, y la conservación del **medioambiente**.

Si bien tradicionalmente la sanidad animal ha tenido un claro enfoque en los animales relacionados directamente con el hombre (*i.e.* animales de abasto y mascotas) en las últimas décadas las enfermedades de los animales silvestres han adquirido una mayor consideración (Stephen, 2014). Según Gortázar *et al.* (2007) las **enfermedades de la fauna silvestre que resultan prioritarias** para su estudio y gestión sanitaria son aquellas en las que los animales silvestres tienen una alta probabilidad de afectar sustancialmente al estatus sanitario regional de especies de producción y, además, los patógenos impactan directamente sobre la sanidad animal, la salud pública, la economía y la conservación y el manejo de la vida silvestre.

Enfermedades como la TB, la gripe aviar o la rabia entrarían dentro de esta categoría (Gortázar *et al.*, 2007). Sin embargo, existen aún muchas enfermedades para las que resulta complicado poder definir con claridad estos criterios, como la LA o la diarrea vírica bovina. En enfermedades nuevas, como la ESB, la fauna silvestre es uno más de los múltiples factores a estudiar para comprender el alcance que la enfermedad puede tener. Estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de obtener más evidencias científicas que permitan priorizar los esfuerzos sanitarios hacia aquellas enfermedades que realmente tengan un impacto sobre la sanidad animal y la salud pública.

1.3.2 Fases de la gestión sanitaria de enfermedades en fauna silvestre

Un correcto **programa de gestión sanitaria para la fauna silvestre** debería cumplir fundamentalmente **dos objetivos**: (1) reducir el impacto social, sanitario, económico y ecológico de los patógenos en los animales silvestres y (2) cumplir con las obligaciones internacionales para detectar y notificar la presencia de patógenos importantes para el ganado y los humanos en las poblaciones silvestres (Warns-Petit, 2009). Para cumplir con estos objetivos, la gestión sanitaria se podría dividir en **cuatro fases** (Figura 5): prevención, vigilancia (monitorización), control y comunicación-educación (OIE, 2010).

La **prevención** de problemas sanitarios en la interfaz HDS debe comprender acciones sobre los animales silvestres, ya que, de hecho, en muchas ocasiones estos están más expuestos a los patógenos, por lo que podrían comportarse como indicadores precoces de amenazas para la salud pública y la sanidad animal (Warns-Petit *et al.*, 2009). Por ello, en primer lugar, se deberían identificar los patógenos que tengan más opciones de incurrir en las poblaciones silvestres, lo que se conoce como **escaneo horizontal** (Miller *et al.*, 2013). Asimismo, entre las medidas de **reducción de riesgo** para prevenir la transmisión de patógenos (Miller *et al.*, 2013), se podrían citar la mejora de los sistemas de producción de ganado sobre todo en cuanto a la bioseguridad, o estrategias para limitar el contacto del ganado y la fauna silvestre mediante vallados eficaces, perros y otros dispositivos disuasorios, como el empleo de barreras selectivas a prueba de ganado o fauna silvestre para segregar el uso de recursos entre ambos (Barasona *et al.*, 2013). Además, un eficaz control fronterizo resulta fundamental de cara a frenar las potenciales entradas y salidas de patógenos asociadas tanto a las translocaciones locales de animales silvestres como a su traslado o comercio internacional.

Figura 5. Esquema de las fases de la gestión sanitaria en fauna silvestre. Hay que destacar que estas etapas (*i.e.* prevención, vigilancia-monitorización, control y comunicación-educación) no son consecutivas, sino que están interrelacionadas y pueden funcionar simultáneamente.

Estas actividades están estrechamente vinculadas con la **vigilancia** y la **monitorización**. La vigilancia se diferencia de la monitorización en que los esfuerzos que se realizan llevan como último objetivo el control de la enfermedad, mientras que la monitorización se limita a determinar la presencia de las enfermedades y conocer sus tendencias espaciotemporales.

Así pues, la vigilancia tiene como fines (1) conocer cómo se distribuyen los patógenos endémicos en fauna silvestre, así como el rango de hospedadores, (2) detectar patógenos emergentes y (3) fortalecer la capacidad de controlar e incluso erradicar las enfermedades (Warns-Petit, 2009). Estos aspectos se desarrollarán en detalle en las secciones siguientes.

Una vez se haya identificado alguna enfermedad en la interfaz HDS, se deben poner en marcha mecanismos de **control** del patógeno para reducir el impacto del mismo sobre todos los componentes de la interfaz. Las principales medidas de control de patógenos en los animales silvestres (Gortázar *et al.*, 2007; Wobeser, 2007; OIE, 2010) se podrían agrupar en:

- **Medidas higiénicas**: gestión de los cadáveres de animales silvestres, manejo adecuado de las canales de animales abatidos, etc.
- **Control de vectores**: las acciones encaminadas a disminuir las poblaciones de vectores son en la práctica poco efectivas, debido, principalmente, a la abundancia de las especies normalmente implicadas y a su ubicuidad.
- **Gestión de hábitat**: especialmente a través de la modificación de la densidad animal y del entorno en el que viven (p.ej. drenaje o inundación de terrenos, incendios controlados, etc.). Estas estrategias suelen aplicarse para reducir la supervivencia de patógenos o vectores, disminuir las tasas de propagación o reubicar las poblaciones silvestres en zonas más seguras.
- **Tratamiento con medicamentos**: existen diversas formulaciones y vías de administración (p.ej. administración oral mediante cebos, administración intramuscular mediante inyección a distancia) adaptados a la fauna silvestre. Asimismo, se ha planteado el uso de medicamentos para la inmunocontracepción en aras de evitar la transmisión de patógenos vía venérea, así como la difusión a través de material abortivo.
- **Vacunaciones**: es un campo emergente de investigación, ya que la correcta inmunización de los reservorios silvestres podría reducir o incluso eliminar el riesgo de contacto entre fauna doméstica y silvestre. Sin embargo, su desarrollo y aplicación en animales silvestres supone un reto, sobre todo en cuanto a la

elección del patógeno diana y su cepa o tipo, la mejor vía de administración, el seguimiento de la eficacia y potenciales efectos adversos, la limitación de la accesibilidad tan solo a los hospedadores diana y los costes de fabricación y administración. Por ello, todavía es un campo en expansión.

- **Sacrificio selectivo** (o ***culling***): esta medida es una de las más polémicas, ya que no siempre tiene el efecto esperado. Un claro ejemplo podría ser el sacrificio masivo de tejones en el Reino Unido para reducir la TB (revisado en Donnelly *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2012). Tras haber realizado esta práctica desde la década de los 70, no se ha podido demostrar su efecto en la disminución de la incidencia de la enfermedad. Además, el surgimiento de movimientos de sacrificio ilegal de tejones ha comprometido el éxito de las campañas oficiales (Cross *et al.*, 2013). Por tanto, la utilización de esta medida requiere un análisis previo de coste-beneficio, no solo de los recursos sanitarios a invertir, sino también del impacto ambiental que puede ocasionar.

Uno de los aspectos a los que tiene que enfrentarse cualquier medida de gestión sanitaria, más cuando tiene que ver con la vida silvestre, es la opinión pública. Por ello, cualquier actividad desarrollada debería acompañarse de **campañas de educación e información** de manera que se entienda su utilidad y beneficio (Fischer y Gerhold, 2002). Asimismo, resulta vital realizar **campañas de comunicación** con los organismos internacionales involucrados, las administraciones públicas y la prensa (tanto científica como general) para minimizar el impacto que la declaración de un cambio en el estatus sanitario de una población puede provocar.

Todas estas campañas deberían ser extensivas tanto a los sectores profesionales relacionados con la fauna silvestre como al público general. De hecho, involucrar a los profesionales que trabajan con la fauna silvestre en la comunicación puede hacer que esta incluso tenga un mayor impacto (Decker *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que todas las actividades descritas para estas tres etapas no implican una ejecución secuencial. De hecho, la mejor manera de optimizar los recursos conlleva la **consideración integral** de las cuatro, así como su **revisión en conjunto** en los casos en los que la situación de la enfermedad cambie.

1.3.3 Objetivos de los programas sanitarios para enfermedades infecciosas

El diseño de un buen programa de gestión sanitaria va a depender, fundamentalmente, del conocimiento existente sobre la situación de la enfermedad en la región de interés. Según esto, se pueden plantear distintos objetivos sanitarios en función del escenario y del estatus de la enfermedad (Martínez-Avilés *et al.*, 2014).

- **Detección precoz de enfermedades nuevas, exóticas o reemergentes**: para maximizar la detección de las mismas, este sistema debería contemplar diseños de vigilancia para una máxima cobertura poblacional con una prevalencia de enfermedad baja (Cameron, 2012). Así pues, se recomendaría el muestreo continuo, ya que cualquier variación en la tendencia basal podría suponer una sospecha. Para plantear un sistema de este tipo basado en riesgo, se deberían seleccionar animales en los que se pueda detectar el patógeno fácilmente, o que tengan una mayor oportunidad de contraer y/o transmitir la infección.
- **Demostración de estar libre enfermedad cuando un país acaba de conseguir la erradicación**: en estos casos, para optimizar los esfuerzos sanitarios, se recomienda realizar las acciones en subpoblaciones, áreas y periodos en los que la probabilidad de infectarse y/o transmitir los patógeno sea mayor. No es necesario que el muestreo en este caso sea continuo, y se debería usar una prevalencia de diseño mayor que en la detección precoz (Cameron, 2012). Actualmente, la consecución de este estatus en las poblaciones silvestres no resulta plausible (Stephen, 2014).
- **Búsqueda de casos y estimación de la prevalencia cuando la enfermedad está presente o incluso es endémica**: en este supuesto, la vigilancia puede ayudar a demostrar la efectividad de las medidas de prevención y control en marcha. Para ello, se debe recurrir a un muestreo representativo de la población para evitar el sesgo, adquiriendo una muestra lo suficientemente grande como para conseguir una precisión adecuada (Cameron, 2012).

Pese a la delimitación de estos objetivos sanitarios, los patógenos circulan en las poblaciones de una manera dinámica, por lo que habrá que tener puestos a punto todos los componentes anteriores para ir adaptando el sistema sanitario según varíe el ciclo de la enfermedad (Figura 6).

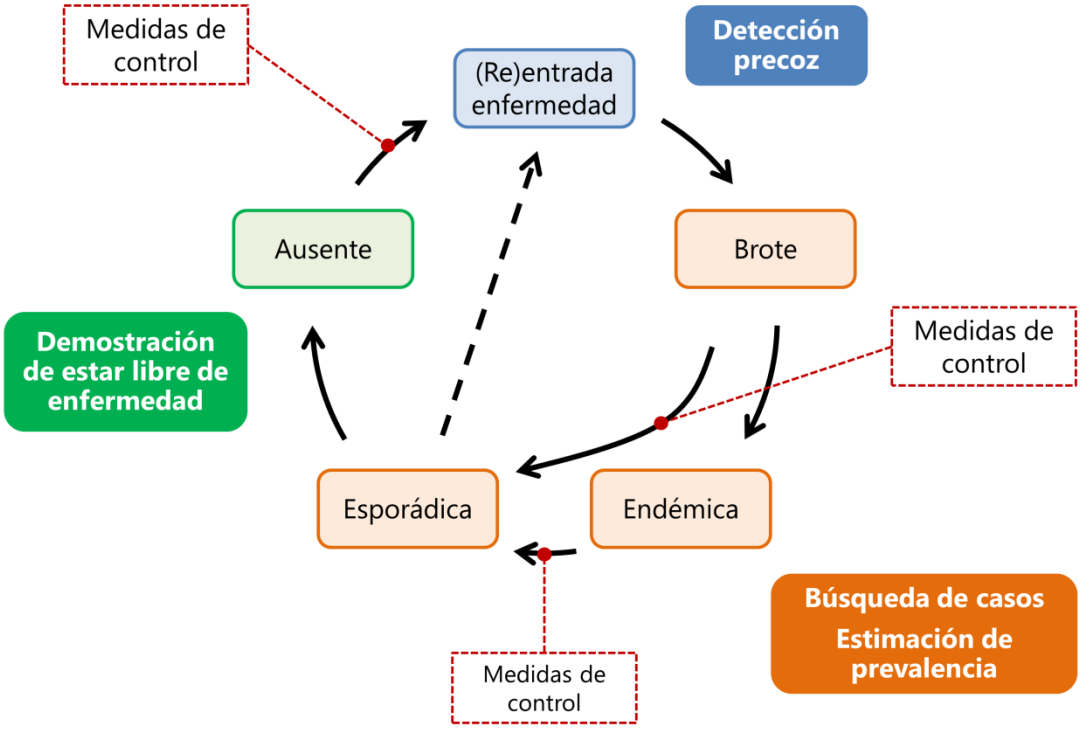


Figura 6. Ciclo de la enfermedad en relación a los distintos objetivos de vigilancia. Además, en la figura se indican los momentos en los que se pueden poner en marcha medidas de control [Fuente: adaptación de Martínez-Avilés *et al.*, 2014]

Para establecer las acciones de partida más adecuadas, lo primordial es conocer la situación de la enfermedad en la región de interés. Esta interpretación está sujeta a variaciones según se contemple desde un punto de vista científico o comercial, ya que puede tener unas fuertes connotaciones de cara al comercio (Martínez-Avilés *et al.*, 2014). Las situaciones más polémicas son, precisamente, aquellas en las que la enfermedad está presente en la fauna silvestre y el ambiente, pero no en los animales domésticos. En estos casos, los animales domésticos solo están expuestos a un riesgo real en determinadas circunstancias (Martínez-Avilés *et al.*, 2014).

Por ello, desde el Código Terrestre de la OIE (2013) se contemplan dos enfoques en función de las características de la enfermedad y las opciones de control de la misma (de Clercq, 2011):

- **El estatus de la infección en la fauna silvestre no afecta** el estatus de los animales domésticos, debido a que:
  - No es posible el control en estas especies y todos los países comparten en esencia el mismo riesgo (p.ej. en el caso de la gripe aviar).

- El control es posible y la separación y la reducción de la transmisión entre animales domésticos y silvestres resulta factible (p.ej. en el caso de la brucelosis o la enfermedad de Aujeszky).

- **El estatus de la infección en la fauna silvestre afecta** el estatus de los animales domésticos, debido a que:
  - La enfermedad es vectorial y por ello la separación y la reducción de la transmisión entre poblaciones resulta difícil de realizar [p.ej. en el caso de la enfermedad de West Nile (EWN)].
  - La enfermedad es altamente contagiosa y se difunde fácilmente de animales silvestres a domésticos (p.ej. fiebre aftosa).

La OIE (2013) contempla para este tipo de situaciones la **zonificación** y la **compartimentación**, siempre y cuando la interfaz DS pueda quedar geográficamente definida. Estas opciones dependerán en gran medida del conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad en cuestión, así como de la eficacia de las medidas de prevención y control que existan (Fischer y Gerhold, 2002). Sin embargo, muchos países muestran todavía rechazo a declarar ciertas enfermedades por las potenciales consecuencias negativas para el comercio (de Clercq, 2011).

1.3.4 Ámbito de la vigilancia sanitaria en animales silvestres en el contexto internacional y europeo

Tradicionalmente, la mayoría de las estrategias para vigilancia se han desarrollado para los animales domésticos. Sin embargo, en los últimos años, la vigilancia de las enfermedades de la fauna silvestre, en concreto la detección precoz, se ha constituido como un área emergente de investigación (Mörner *et al.*, 2002).

Entre los primeros países en desarrollar sistemas específicos de vigilancia enfocados en fauna silvestre, se encuentran **Dinamarca** (Christiansen, 1935) y **Suecia** (Borg, 1975). Estos programas, que arrancaron los años 30 y 40 respectivamente, se centraban en el examen de muestras procedentes de animales silvestres que llegaban a los laboratorios de sanidad animal nacionales. A partir de entonces, otros países como Reino Unido, Italia, España, Francia, Suiza, Noruega y Finlandia han ido desarrollando programas de gestión sanitaria de la fauna silvestre, cada vez más tecnificados.

La primera revisión del **estado de la vigilancia de fauna silvestre en Europa** se llevó a cabo a mediados de los noventa (Leighton, 1995). De los 26 países europeos examinados, tan solo los cuatro países escandinavos tenían sistemas de vigilancia integrales y específicos para animales silvestres. En el resto de países existían grandes diferencias en el número y extensión de las actividades de vigilancia, llegando a ser nulas en algunos países (Leighton, 1995). Sin embargo, en todos los países se disponía de información significativa sobre la aparición de enfermedades entre la fauna silvestre, mientras empezaba a surgir una concienciación acerca de las ventajas de la vigilancia dirigida en animales silvestres.

Desde entonces, fueron surgiendo pequeñas colaboraciones entre distintos grupos de investigación y organismos europeos que sirvieron para ir sentando las bases para la cooperación internacional en este campo. De hecho, a principios de la década de 2000 se impulsó mediante un proyecto europeo la creación de una red de profesionales e instituciones relacionadas con la sanidad de la fauna silvestre conocida como ***European Network on Wildlife as Reservoirs of Pathogens***, con el fin de (1) establecer una lista de patógenos de animales silvestres de importancia para Europa, (2) poner en marcha un sistema de alertas epidemiológicas y (3) identificar la infraestructura de laboratorio disponible para el estudio de estas enfermedades (Briones, 2000).

A nivel internacional, la **OIE** ha jugado un papel muy importante en los últimos años para resaltar la importancia de la gestión sanitaria de las enfermedades de la fauna silvestre. De hecho, el Director General de la OIE Bernard Vallat (2008) indicó que "la vigilancia de las enfermedades de la fauna silvestre debe ser considerada con la misma importancia que la vigilancia y el control de enfermedades en animales domésticos".

En 1994, se creó el **grupo de trabajo de las enfermedades de la fauna silvestre**. Este grupo lo conformaron expertos internacionales sobre la fauna silvestre con el fin de impulsar la vigilancia y el control de las enfermedades infecciosas en este sector. En concreto, se empezaron a examinar detalladamente los casos de enfermedades en los animales silvestres, para poder terminar estableciendo un procedimiento específico de vigilancia para la fauna. Además, se creó una lista de enfermedades (tanto infecciosas como no infecciosas) (Anexo 2) no incluidas en la lista de la OIE, pero que deberían ser

prioritarias por su impacto en la fauna silvestre y como alerta temprana para la sanidad animal y la salud pública. Si bien se lleva muchos años notificando los casos de enfermedades de declaración obligatoria en la fauna silvestre por el sistema de notificación habitual de la OIE (*Handistatus* hasta 2004, *WAHIS* en adelante), la información concerniente a la lista de fauna silvestre se empezó a recopilar voluntariamente desde 1993, primero anualmente, y desde 2008 semestralmente. En la actualidad, la OIE ha puesto en marcha una nueva plataforma (**WAHIS-Wild**) para consultar la información relativa a estas enfermedades enviada por los Países Miembros.

Por otro lado, para poder coordinar los esfuerzos internacionales para la declaración y lucha de las enfermedades infecciosas, se creó una plataforma digital conocida como **GLEWS** (***Global Early Warning System***). De esta forma, los países miembros de la OIE, la OMS y la FAO han suscrito acuerdos para la declaración de ciertas enfermedades infecciosas humanas y animales (tanto domésticos como silvestres). Recientemente se mejoró este sistema mediante la inclusión de zoonosis, denominándose **GLEWS+** (2013).

A su vez, importantes **asociaciones profesionales internacionales**, como la Asociación sobre las Enfermedades de la Fauna Silvestre (***Wildlife Disease Association*, WDA**) o la Asociación Europea sobre las Enfermedades de la Fauna Silvestre (***European Wildlife Disease Association*, EWDA**) apoyan todas estas medidas e impulsan la colaboración y el intercambio de información entre especialistas en sanidad de los animales silvestres (Kuiken *et al.*, 2011). Con este fin, la EWDA se propuso organizar una reunión en 2009 con miembros representantes de los países europeos para conocer, como se hizo en los 90 (Leighton, 1995), el nivel de vigilancia en fauna silvestre en Europa. Según las conclusiones obtenidas tras la reunión, solo 14 de los 25 países europeos representados habían realizado en los últimos años algún tipo de actividad de vigilancia en las poblaciones de animales silvestres (Kuiken *et al.*, 2011). Por tanto, surge la necesidad de impulsar la vigilancia de la fauna silvestre a nivel internacional y sugerir un conjunto de actividades adecuadas que puedan ser puestas en marcha por los países con relativa facilidad.

1.3.5 Componentes de la vigilancia en poblaciones silvestres

Según el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE, la **vigilancia de la fauna silvestre** podría definirse como la recogida, cotejo y análisis sistemático y continuo de información relacionada con la sanidad de la fauna silvestre y la diseminación oportuna de tal información de manera que se puedan tomar decisiones e iniciar una acción sanitaria. Con carácter general, las acciones relacionadas con la vigilancia pueden dividirse en vigilancia pasiva y vigilancia activa.

La **vigilancia pasiva** se caracteriza por el uso de información recogida de rutina o de manera eventual para algún otro propósito. Un ejemplo de ello es la investigación que sigue a un incremento anormal en la tasa de individuos enfermos o muertos. De hecho, normalmente estas actividades sirven como indicadores precoces en la vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes.

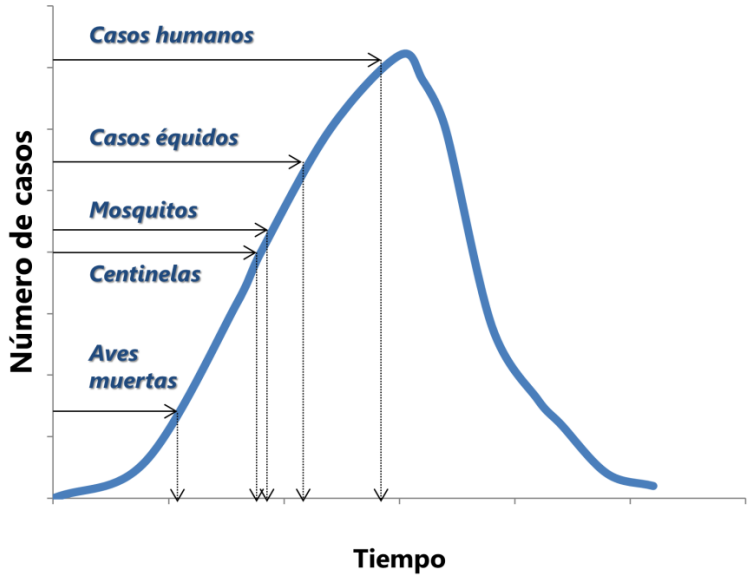


Figura 7. Curva epidémica de la enfermedad de West Nile. En el gráfico se muestran las actividades de vigilancia (en azul y cursiva) que se pueden poner en marcha para esta enfermedad y en qué momento de la curva epidémica estarían detectando la infección [Fuente: adaptación de CDC].

Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de West Nile (EWN) (Figura 7), se ha visto que antes de que empiecen a ocurrir brotes en caballos o humanos suele haber eventos de enfermedad y/o mortalidad masiva en aves peridomésticas, principalmente córvidos (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, en revisión). La **investigación de estos eventos inusuales** resulta por tanto esencial de cara a determinar la causa de estos brotes y su potencial repercusión en las poblaciones humanas y animales (Mörner *et al.*, 2002).

Sin embargo, la principal limitación que presenta este tipo de actividades de vigilancia es que los eventos no son siempre fáciles de reconocer a tiempo, ya que suelen ser de corta duración. En ocasiones, su alcance se limita al envío de muestras aisladas a laboratorios de sanidad animal. Para que tengan la utilidad que se merecen, estos muestreos deberían acompañarse de la máxima **información epidemiológica y medioambiental** y debería intentar estimarse el número de animales afectados para determinar el alcance del brote en la población silvestre expuesta (Mörner *et al.*, 2002). Por ello, de cara a optimizar el valor de la vigilancia pasiva, se recomienda el establecimiento de **campañas de concienciación** entre los sectores relacionados con la fauna silvestre y el público general.

La **vigilancia activa** comprende aquellas acciones en las que se va a buscar el patógeno de manera proactiva (Hoinville *et al.*, 2013) mediante el muestreo de la población de interés y la determinación de la infección mediante técnicas diagnósticas directas y/o indirectas. Hay varios **métodos estadísticos** para definir cuáles y cuántas deben ser las muestras para que el muestreo sea representativo de la población. La prevalencia también debería ser considerada en la definición del muestreo, ya que por debajo de unos niveles, conviene usar **evidencias epidemiológicas** más que estadísticas (Hugh-Jones *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso de la fauna silvestre, en muchas ocasiones la toma de muestras se limita a animales abatidos o encontrados muertos, por lo que el muestreo tiene una naturaleza más bien **oportunista o conveniente**.

Todas estas actividades proporcionan una valiosa información y amplían el normalmente escaso conocimiento sobre patologías y agentes infecciosos en animales silvestres, así como nuevos rangos de hospedadores. Para mejorar la eficacia y rentabilidad de tales acciones, debe haber un adecuado diseño de muestreo (tanto de animales vivos como muertos). De cara a sacar el máximo partido del muestreo, la **recogida y preservación de las muestras** debe realizarse siguiendo unos protocolos adecuados para los patógenos diana y según las técnicas diagnósticas a emplear. Acompañando a las muestras se debería recoger, además, **información cuantitativa y cualitativa** sobre las mismas, incluyendo la localización geográfica, datos biológicos y ecológicos de los animales, determinación de la edad y del sexo, hallazgos clínicos y/o patológicos, etc.

El **seguimiento de los sistemas de vigilancia** en el espacio y en el tiempo permite conocer cuáles son las infecciones más importantes, así como su nivel basal en las poblaciones silvestres (Williams *et al.*, 2002). Esta monitorización permanente, cuando tiene una base estadística, proporciona una fuente fiable para analizar el riesgo de las enfermedades para o desde la fauna silvestre (Mörner y Beasley, 2012).

1.3.6 Programas de vigilancia sanitaria para la fauna silvestre en España

En España, el interés por las actividades de vigilancia de los animales silvestres surgió en la década de los 80, promovido por la emergencia de la enfermedad hemorrágica del conejo (Boadella *et al.*, 2011).

Desde entonces se ha ido incrementando con el paso de los años el trabajo relacionado con la sanidad de la fauna silvestre, con la creación de varios grupos de investigación de dedicación exclusiva a este ámbito de la sanidad animal, así como con la inversión de importantes fondos económicos tanto públicos como privados para impulsar la investigación y desarrollo de este campo.

El reflejo de ello es la creación y puesta en marcha del **programa de vigilancia sanitaria en fauna silvestre (PVSFS)**. Este programa tiene como objetivos conocer la situación sanitaria de la fauna silvestre en España, prevenir la difusión de enfermedades entre animales domésticos y silvestres y proteger la salud pública (RASVE, 2013).

Las actividades consideradas en este programa se aplican a todo el territorio nacional, siempre en coordinación con las medidas contempladas en los **programas de vigilancia nacionales**, los **programas autonómicos y regionales específicos**, los **programas de fauna propios de espacios naturales** y la **información aportada por otras entidades**, tales como ONGs, centros de recuperación, etc.

El PVSFS contempla **actividades de vigilancia activa y pasiva**. Las principales diferencias entre estas actividades en el contexto del programa español se resumen en la Tabla 4.

Además, el PVSFS dispone de una lista de enfermedades relevantes en función del taxón (Tabla 5). Para cada enfermedad se especifican las muestras y las pruebas diagnósticas de elección.

Tabla 4. Características diferenciales de las actividades de vigilancia activa y pasiva contempladas en el programa nacional de vigilancia de fauna silvestre [Fuente: elaboración propia con datos de RASVE, 2013].

	Vigilancia activa	Vigilancia pasiva
Objetivo	Búsqueda de agentes patógenos específicos	Identificación de la causa de la enfermedad o de la muerte
Especies	Enfocado a especies conflictivas desde un punto de vista sanitario y a especies cinegéticas (mejor acceso)	No limitado (especial atención a mortalidades masivas o no atribuibles a causas antropogénicas)
Enfermedades	Enfocada a enf. de mayor impacto social, económico o ecológico (ver Tabla 5)	No limitado
Tipo de muestreo	Aleatorio, según la abundancia de especies en cada región	No aleatorio
Diseño de muestreo	En base a prevalencia de 5% (excepto bóvidos, 10%) con I.C. 95%	Sin diseño

Tabla 5. Principales enfermedades infecciosas objeto del programa nacional de vigilancia de fauna silvestre. En rojo se destacan las enfermedades importantes para cada especie o grupo taxonómico. En verde se indican las incluidas en el plan específico de jabalíes. En algunas celdas se indica la especie o grupo taxonómico en el que se enfoca la vigilancia [Fuente: adaptación de RASVE, 2013 y 2014a].

	Mamíferos silvestres						Aves silvestres
Enfermedades	**Jabalí**	**Cérv.**	**Bóv.**	**Carnív.**	**Lagom.**	**Roed.**	
Encefalopatías espongiformes transmisibles							
Enfermedad de Aujeszky							
Enfermedad de West Nile							
Enfermedad vesicular porcina							
Infección por pestivirus			Rebeco				
Influenza aviar altamente patógena							
Moquillo							
Peste porcina africana							
Peste porcina clásica							
Rabia							
Infección por *Brucella abortus*							
Infección por *Brucella melitensis*							
Infección por *Brucella suis*							
Tuberculosis bovina				Tejón			
Tularemia					Liebre ibérica	Micrótidos	
Equinococosis/hidatidosis				Lobo			
Sarna sarcóptica							
Triquinelosis							

Desde 2014 se ha puesto en marcha un **programa de vigilancia serológica activa específico de jabalíes** en el territorio peninsular (RASVE, 2014a), con el fin de **garantizar la ausencia** de tres enfermedades infecciosas de gran impacto, las pestes porcinas (clásica y africana) y la enfermedad vesicular, así como **monitorizar espaciotemporalmente la distribución** de la enfermedad de Aujeszky, de la que se sabe que prevalece en nuestro país en las poblaciones de jabalí de manera muy variable según la región (Tabla 5). Para cumplir con los objetivos de este programa, se han de tomar **1.497 muestras** repartidas por las distintas provincias peninsulares.

Todas las **actividades de vigilancia activa en fauna silvestre** contemplan muestreos aleatorios en base a una prevalencia de diseño específica para cada taxón y enfermedad. Asimismo, el número de muestras a recoger en cada una de las provincias se repartirá en función de la abundancia de especies y en función de las BRs (Figura 2). Sin embargo, el acceso a este tipo de muestras podría suponer una limitación, ya que el manejo de estos animales resulta difícil (e incluso imposible) en determinadas especies. Por ello, la vigilancia activa se vale de otras actividades para alcanzar sus objetivos, fundamentalmente eventos cinegéticos y ciertas operaciones de manejo de la fauna. El valor que tienen estas muestras hace que su conservación sea un hecho imprescindible. Por ello, el PVSFS potencia la creación de **serotecas** e **histotecas** para poder acceder a ellas con el fin de realizar estudios retrospectivos.

1.4 Herramientas epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de las enfermedades en la fauna silvestre

1.4.1 Dificultades y limitaciones de la vigilancia en fauna silvestre

Actualmente, la vigilancia en animales silvestres se encuentra varios pasos por detrás de la desarrollada para los animales domésticos. De hecho, normalmente el número de especies y áreas geográficas cubiertas son inferiores en comparación con la multitud de especies silvestres (*i.e.* más de 15.000 especies de mamíferos y aves) y su distribución mundial (Kuiken *et al.*, 2005).

Podría haber varias razones que expliquen la dificultad para aplicar las actividades de vigilancia en las especies silvestres. Dentro de las **razones biológicas** (Giovannini, 2006; Warns-Petit *et al.*, 2009) podrían citarse el acceso limitado a las poblaciones silvestres debido a la **amplia extensión de sus hábitats** o la suma de factores ambientales, etológicos y de hábitat que influyen en la **densidad animal** y, así, en el impacto de las enfermedades sobre las poblaciones animales. Esto hace que en ocasiones los focos de enfermedades en fauna silvestre pasen inadvertidos o que su detección se vea retardada. Además, la gran **diversidad taxonómica** de la fauna silvestre complica la asignación correcta de la especie silvestre involucrada en un brote infeccioso (Moutou, 2004). De hecho, en el sistema de registro de brotes WAHIS de la OIE, a la hora de notificar un brote de una enfermedad de declaración obligatoria, no se precisa de la especie de animal silvestre, sino simplemente que es silvestre.

Por otra parte, el **comportamiento elusivo** de los animales silvestres hace difícil su captura para la toma de muestras y su posterior recaptura para realizar un seguimiento (Fischer y Gerhold, 2002). El **estrés** al que se somete a los animales en este manejo restrictivo puede suponer un estado fisiológico que altere los resultados de las pruebas de diagnóstico o incluso la muerte de los mismos (Thorne *et al.*, 2000).

En el caso de las **especies migratorias**, la vigilancia resulta compleja, no solo debido a la rápida dispersión de los patógenos, más allá de las fronteras políticas, sino también a la dificultad de un diseño adecuado de los muestreos (Mörner y Beasley, 2012). Este hecho se dificulta aún más en el caso de las aves, ya que hay que considerar no solo las largas rutas migratorias de invierno y de verano, sino los movimientos cortos que incluso

realizan las especies residentes, los cuales entrañan incluso un mayor riesgo (Martínez Avilés, 2010). De hecho, el interés por comprender esta situación se ha incrementado en los últimos años: en una revisión bibliográfica sobre vigilancia de enfermedades emergentes se observó que 25 de los 34 artículos relacionados con la fauna silvestre trataban sobre aves migratorias (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2014b).

También pueden surgir dificultades cuando se aplican las **pruebas de diagnóstico a las especies silvestres**. Además del problema de **acceso a las muestras** anteriormente comentado, se requiere un **entrenamiento para su recogida y envío** a los centros que realizan el diagnóstico, en ocasiones deficitario. **La conservación y el estado de las muestras** son aspectos claves para garantizar la precisión del diagnóstico (Boadella y Gortázar, 2011).

Los protocolos de diagnóstico para detectar o aislar el agente etiológico (*i.e.* **pruebas directas**) suelen tener una sensibilidad y especificidad similar para las especies domésticas y la mayor parte de especies silvestres (Fischer y Gerhold, 2002). Sin embargo, el uso de **pruebas serológicas o *in vitro*** desarrolladas para las especies domésticas puede plantear problemas, por lo que deberían ser validadas para cada caso (Gardner *et al.*, 1996). También hay que tener en cuenta los problemas que pueden surgir en el diagnóstico de ciertos patógenos por **reacciones cruzadas con otras enfermedades relevantes**. Un ejemplo típico de estas reacciones es el que ocurre en las infecciones de los virus de la familia *Flaviviridae* (Calisher *et al.*, 1989) en concreto los pestivirus (Langedijk *et al.*, 2001).

Por otro lado, las **estimaciones de prevalencia de enfermedades en la fauna silvestre** suele hacerse a través de **muestreos convenientes u oportunistas** (Staubach *et al.*, 2002). Además, estos análisis se suelen agregar en escalas espaciales basadas en **delimitaciones administrativas**, tales como municipios. Estas estimaciones, por tanto, conllevan un sesgo inherente dadas las variaciones en el tamaño de muestra o las dependencias espaciales entre áreas vecinas (Staubach *et al.*, 2002; Hardstaff *et al.*, 2013). Además, pese a los esfuerzos por obtener un gran número de animales, la **cobertura del muestreo** suele ser limitada por razones logísticas o económicas (Müller *et al.*, 1998; Tackmann *et al.*, 1998). Por ello, la detección de patrones epidemiológicos espaciales entre las poblaciones silvestres resulta complicada.

1.4.2 Nuevos horizontes en la vigilancia en fauna silvestre

Dado que los recursos destinados al estudio de las enfermedades en la fauna silvestre son limitados y las dificultades que el mismo conlleva, la vigilancia debe basarse en la **cooperación entre organismos** y **estructurarse** de manera que se obtenga el máximo de información de los cadáveres, los animales capturados u otras fuentes (Fischer y Gerhold, 2002). Asimismo, las conclusiones obtenidas deberían ser compartidas por todo el mundo de cara a prevenir la difusión transfronteriza de los agentes infecciosos y a asegurar un correcto estatus sanitario a nivel internacional. Afortunadamente, múltiples organismos han trabajado en los últimos años para crear una **red internacional de vigilancia sanitaria de la fauna silvestre** y fomentar la cooperación entre los profesionales de salud pública y sanidad animal (Kuiken *et al.*, 2011).

Todos estos esfuerzos internacionales se han traducido en el desarrollo de técnicas y métodos aplicables a la fauna silvestre. Recientemente se han realizado revisiones bibliográficas con el fin de recoger **estrategias y metodologías útiles para la vigilancia**, específicamente para los siguientes objetivos:

- **Detección precoz de enfermedades emergentes** (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2014b): se encontraron 34 artículos (de 128 analizados, 26,6%) que describían métodos aplicados a fauna silvestre.
- **Demostración de estar libre de enfermedad** (Schauer *et al.*, en revisión): en este caso, se destacaron solo 8 artículos (de los 134 analizados, 6,0%).
- **Estimación de prevalencia y detección de casos de enfermedades endémicas** (Comin *et al.*, en revisión): se analizaron 13 artículos (de 69 incluidos, 18,8%) respecto a la vigilancia de enfermedades endémicas en fauna silvestre.

Además, cada vez se reconoce más la necesidad de **integración de estudios epidemiológicos, de laboratorio y ecológicos** para poder comprender cómo se transmiten los patógenos y cómo persisten en las poblaciones silvestres (Real y Biek, 2007; Archie *et al.*, 2009; Biek y Real, 2010; Cowled *et al.*, 2012). Por tanto, el desarrollo de nuevas metodologías y la integración de estas abren nuevos horizontes en un mundo en el que quedan todavía muchos aspectos por desentrañar.

1.4.3 Herramientas diagnósticas para el estudio de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre

En las últimas décadas las **técnicas diagnósticas** están experimentando un fuerte desarrollo. Existe una amplísima variedad de kits comerciales que facilitan y agilizan la detección de patógenos y anticuerpos en un corto periodo de tiempo (Anexo 3). Gracias a la facilidad de obtención de reactivos (como proteínas antigénicas sintéticas o anticuerpos monoclonales), la versatilidad de las técnicas de biología molecular y la gran competitividad de institutos públicos y empresas privadas para estos fines, el mundo del diagnóstico está en su máximo apogeo.

Debido a la utilidad que tradicionalmente han tenido estas técnicas, la mayoría de los kits diagnósticos se comercializan para su uso en muestras de los principales animales domésticos. Antes de utilizar un kit para muestras procedentes de animales silvestres, hay que conocer las características del kit y las de la muestra para poder garantizar el resultado. Por ejemplo, los **kits serológicos indirectos** se basan en la detección de posibles anticuerpos presentes en la muestra mediante la unión con el antígeno de interés. En el caso del **técnicas indirectas p.d.**, para revelar esta unión, se incorpora un anticuerpo secundario marcado que se unirá al anticuerpo de la muestra. Para que esta unión sea específica, el anticuerpo marcado (generalmente monoclonal) debe tener máxima afinidad por las inmunoglobulinas de la especie en cuestión. Este hecho explica por qué en ocasiones no resulta viable emplear kits comerciales diseñados para animales domésticos en especies silvestres. Por ello, una alternativa sería desarrollar o emplear un **kit serológico de competición o bloqueo**, en el que los anticuerpos secundarios tienen afinidad por el antígeno, por lo que se solventa el problema de sensibilidad. Asimismo, realizar **dos pruebas serológicas en paralelo** es otra opción para garantizar que el resultado sea correcto (Dove y French, 2014).

Estos problemas no afectan a las **técnicas de detección directa**. Sin embargo, el reto al que se enfrentan estos ensayos es que en ocasiones no se cuenta con la muestra adecuada para detectarlo. Además, la labilidad de los patógenos (principalmente los virus ARN) hace que, aunque la muestra sea la correcta, si la conservación o el procesamiento de la misma no han sido rigurosos, ya no se pueda detectar el agente. Por ello, se dispone de varios **métodos de control interno** que garanticen que toda la

manipulación de la muestra ha sido adecuada, desde su recogida en el animal hasta el momento de obtener un diagnóstico (revisado en Hoffmann *et al.*, 2006). Para la PCR, uno de estos métodos es la utilización de genes de gestión interna o *housekeeping*. Estos genes se expresan de manera constitutiva en el animal, ya que corresponden a proteínas reguladoras o estructurales básicas (p.ej. β-actina, GAPDH, chaperonas, proteínas ribosomales, etc.). Al transcribirse en forma de ARN mensajero, estos genes se pueden amplificar durante la PCR o la RT-PCR añadiendo los cebadores (o *primers*) específicos junto con los propios del patógeno diana. Así pues, detectarlos en las muestras implica que el manejo y tratamiento de las mismas han sido adecuados (o al menos se ha evitado la degradación de los ácidos nucleicos). Aunque la mayoría de los estudios con controles internos se han desarrollado para especies domésticas, cada vez surgen más opciones para especies silvestres, ya sea por descubrimiento de genes propios o por comprobación de la utilidad de genes de animales domésticos para animales silvestres (Wilson y White, 1998; Lindquist *et al.*, 2011; Vasickova *et al.*, 2012).

Sin embargo, la enorme variabilidad genética en los patógenos de la fauna silvestre hace que en ocasiones no se pueda emplear una técnica directa dirigida a un agente patógeno en concreto. Por ello, desde hace unos años ha empezado a hacerse común el empleo de la **metagenómica**. Esta técnica, basada en una amplificación masiva inespecífica, una pirosecuenciación y un cotejo de múltiples bases de datos de secuencias genéticas, permite detectar con una única muestra todas las secuencias génicas encapsuladas presentes en la misma. La metagenómica ya ha demostrado su utilidad para la caracterización de agentes patógenos emergentes, como en el caso del VSB, cuya detección en el momento de los primeros brotes no era posible por los métodos convencionales (FLI, 2011). Por el momento esta técnica es costosa, pero ya ha plasmado su utilidad en la fauna silvestre (Bodewes *et al.*, 2013; Bodewes *et al.*, 2014; Temmam *et al.*, 2014).

Hay otras técnicas de utilización minoritaria, que presentan grandes ventajas para el estudio de la fauna silvestre, como podría ser la **termografía infrarroja**. Esta técnica se basa en la recepción y cuantificación de las radiaciones térmicas emitidas y reflejadas por los cuerpos, y su posterior digitalización en **imágenes térmicas**, **termogramas** o **termografías** (Speakman y Ward, 1998).

Así pues, resulta la técnica ideal para la detección de **procesos que cursen con cambios de temperatura**. Por ello, aparte de apoyar la detección de enfermedades infecciosas, esta herramienta puede aplicarse para estudios de termorregulación (que suponen un primer paso de cara a adaptar esta técnica, p.ej. para la detección de fiebre), control y análisis del comportamiento y la reproducción o la estimación de tamaños poblacionales (Cilulko *et al.*, 2013; Rodríguez-Prieto *et al.*, 2013b; Melero *et al.*, en revisión-a; Melero *et al.*, en revisión-b) (Figura 8).

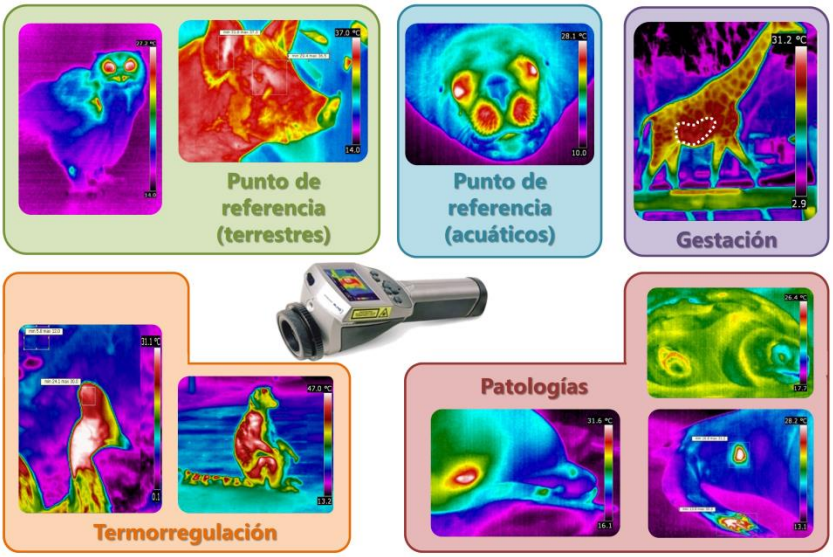


Figura 8. Principales aplicaciones de la termografía en fauna silvestre. En las fotos se muestran, de arriba abajo y de izquierda a derecha: búho real (*Bubo bubo*), cerdo (*Sus scrofa*), león marino de la Patagonia (*Otaria flavescens*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*) gestante, casuario (*Casuarius casuarius*), lémur de cola anillada (*Lemur catta*), delfín mular (*Tursiops truncatus*) con traumatismos en el hocico, león marino con lesiones en las aletas posteriores y tortuga boba (*Caretta caretta*) amputada [Fuente: imágenes del grupo de termografía de SUAT-VISAVET].

Las **ventajas** principales de cara a su aplicación en fauna silvestre son que es una técnica no invasiva, por lo que reduce el estrés del animal e incrementa la seguridad del técnico, permite la exploración en tiempo real en un amplio rango de distancias (*i.e.* desde 50 cm hasta 300 m) y presenta una gran versatilidad de aplicaciones. Como **limitaciones**, habría que destacar la dificultad de relacionar una causa con la variación de temperatura observada y la falta de conocimiento de los patrones térmicos y los puntos de referencia de muchas especies. Supone un reto aún mayor realizar estos estudios en animales acuáticos, ya que el agua superficial en los animales puede distorsionar la medida tomada. Por ello, la utilización de esta herramienta en fauna silvestre abre nuevos horizontes de estudio.

1.4.4 Herramientas epidemiológicas para el estudio de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre

Uno de los retos que plantean los **muestreos en animales silvestres** es que resulta difícil extrapolar los resultados de la vigilancia a la población total expuesta (Scheaffer *et al.*, 2011). Por ello, se ha trabajado en el desarrollo de métodos para **estimar la población silvestre**, por ejemplo a través de las bolsas de caza (Sáez-Royuela y Telleria, 1986; Fernández-Llario *et al.*, 2003; Acevedo *et al.*, 2006). En este sentido, se han desarrollado herramientas epidemiológicas más precisas para **calcular la abundancia relativa y la agregación espacial** de ungulados silvestres (Real *et al.*, 2006; Vargas *et al.*., 2007; Acevedo *et al.*, 2007; 2008; 2010; Ebert *et al.*, 2010; Hardstaff *et al.*, 2013).

Es bastante común que los muestreos en fauna silvestre sean convenientes, lo que podría suponer una pérdida de valor en cuanto a la población general se refiere. Para evitar este problema, han surgido opciones para **aplicar la probabilidad al muestreo** y mejorar así su utilidad, por ejemplo mediante la selección probabilística de las áreas geográficas donde tomar las muestras (Nusser *et al.*, 2008).

La vigilancia epidemiológica tradicional trata de abarcar toda la población susceptible de un determinado territorio. Sin embargo, cada vez se reconoce más la necesidad de enfocar los esfuerzos sanitarios en la población silvestre diana, las zonas y periodos en las que desarrollar el muestreo y las enfermedades más relevantes, así como optimizar el número y tipo de muestras a recoger y las pruebas diagnósticas a emplear (Warns-Petit *et al.*, 2009).

Esto se conoce como **vigilancia basada en riesgo**. Aunque conserva enfoques de la vigilancia tradicional, este tipo de actividades hace uso de información conocida acerca de las enfermedades diana para lograr una efectiva recolección de datos con una mayor eficiencia (menor relación coste/beneficio) (Stärk *et al.*, 2006). En los últimos años ha habido un notable desarrollo de este tipo de metodologías para su aplicación directa en fauna silvestre. Según la clasificación de Hoinville *et al.* (2013), estas metodologías podrían ser útiles para:

- La **priorización basada en riesgo**: se basa en conocer cuáles son las enfermedades o amenazas que tienen mayor probabilidad de ocurrencia, para centrar los esfuerzos de vigilancia en ellas. Por ejemplo, en Nueva Zelanda se desarrolló un sistema basado en el análisis de riesgo de la OIE para determinar qué patógenos se debían vigilar en la fauna silvestre, teniendo en cuenta los riesgos de introducción y difusión, así como el impacto sobre los animales silvestres, los domésticos y los humanos (McKenzie *et al.*, 2007).
- El **análisis basado en riesgo**: consiste en la utilización de información acerca de la probabilidad de ocurrencia de una enfermedad para revisar las consideraciones sobre el estatus sanitario de una población. Los métodos desarrollados pueden tener un enfoque hacia el análisis de riesgo de entrada (p.ej. introducción del virus de la peste porcina africana en la Unión Europea a través de jabalíes, de la Torre *et al.*, 2013; introducción del virus de la gripe H5N1 en España a través de aves acuáticas, Martínez *et al.*, 2009) o de difusión (exposición) (p.ej. estimación de R_0 para la ocurrencia de gripe aviar en poblaciones de aves silvestres europeas, Iglesias *et al.*, 2011).
- El **muestreo basado en riesgo**: se fundamenta en enfocar la estrategia de muestreo en estratos de la población para reducir costes y/o mejorar la precisión. La selección de estratos puede basarse en una mayor probabilidad de detectar la infección, o bien de que el estrato en cuestión se afecte, se infecte, esté infectado, transmita la infección u ocasione un mayor impacto económico o sanitario en la población. Normalmente la identificación de estos estratos en las poblaciones de fauna silvestre permite desarrollar sistemas de vigilancia basados en centinelas [p.ej. muestreo en cuervos (Eidson *et al.*, 2001), anátidas (Ziegler *et al.*, 2010) o incluso ungulados silvestres (Boadella *et al.*, 2012a) para la detección de la EWN].
- El **requisito basado en riesgo**: estos métodos tratan de revisar la intensidad de la vigilancia sobre una población determinada en base a la probabilidad de ocurrencia de una enfermedad para poder alcanzar el objetivo propuesto (p.ej. propuesta de mejora de muestreo de gripe aviar en aves silvestres en España basándose en el riesgo relativo de cada unidad veterinaria, Martínez *et al.*, 2011).

Recientemente la OIE junto con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) han publicado un **manual para el análisis de riesgo de enfermedades de la fauna silvestre** (Dove y French, 2014). Este manual propone una lista de metodologías y un marco de trabajo para abordar las situaciones sanitarias relativas a la fauna silvestre. Dentro de las herramientas propuestas se destaca el valor de la epidemiología espacial como principal disciplina para el estudio las causas y consecuencias de la heterogeneidad espacial de las enfermedades de la fauna silvestre (Dove y French, 2014).

La **epidemiología espacial** permite estudiar las causas y la prevención de las enfermedades mediante el uso de diferentes tipos de análisis en los que la localización espacial de los datos y sus relaciones es un componente fundamental (Pfeiffer *et al.*, 2008). Desde un punto de vista geográfico, la salud de una población se relaciona en mayor o menor medida con las características geográficas del entorno inmediato. Por ello, el estudio espacial de la distribución de una enfermedad es una aproximación básica a sus posibles causas (Ostfeld *et al.*, 2005).

1.4.5 Los sistemas de información geográfica y sus aplicaciones

Los **sistemas de información geográfica (SIG)** son sistemas informáticos para capturar, almacenar, controlar, manipular, analizar y presentar datos que estén espacialmente asociados (Glass, 2001). En definitiva, permiten la presentación dinámica de datos geográficos de una manera clara y fácil de interpretar. Aparte de aportar numerosas opciones de visualización de estos datos, estos sistemas ofrecen una amplia variedad de herramientas analíticas que pueden ser muy útiles para tomar decisiones sanitarias (Robinson, 2000).

Para emprender las medidas preventivas y de control en caso un brote de cualquier enfermedad emergente, es fundamental conocer los niveles de riesgo de cada zona, ya que la actuación será muy diferente (Robinson, 2000). Existen tres técnicas espaciales basadas en los SIG dedicadas especialmente a este fin (Ostfeld *et al.*, 2005): los modelos de decisión multicriterio (MDMC), el análisis de agrupaciones (o *clusters*) y la estimación de factores de riesgo mediante el empleo de modelos estadísticos espaciales.

Los **MDMC** permiten reunir los diversos factores de riesgo, otros modelos evaluados, criterios de expertos, variaciones territoriales, etc., de tal forma que puedan converger todos los datos con el fin de desarrollar una evaluación integral del riesgo que pueda ser empleada en las decisiones de las autoridades sanitarias sobre la prevención y control de la enfermedad en estudio.

Los MDMC comprenden una serie de pasos secuenciales imprescindibles:

1. **Definir los objetivos del estudio**. El MDMC puede servir para conocer la distribución de las zonas de mayor riesgo de entrada y/o difusión de un patógeno, o el mero riesgo de ocurrencia de un brote de enfermedad. También puede servir para conocer la cobertura sanitaria de una región.
2. **Definir los factores de riesgo a incluir**. Para ello, primero hay que seleccionar los más importantes para el objetivo del estudio. De estos, solo se podrán utilizar aquellos de los que se dispongan datos o los que se puedan estimar a través de otros factores. Los principales factores epidemiológicos a considerar se podrían clasificar de la siguiente manera (Martínez-López *et al.*, 2013a):
    a. Relacionados con la fauna doméstica: zonas de alta concentración de animales domésticos susceptibles, bioseguridad de las explotaciones y/o recintos, comercio (legal e ilegal) de ganado vivo susceptible y productos ganaderos contaminados.
    b. Relacionados con la fauna silvestre: zonas de alta concentración de animales silvestres reservorio, movimientos de fauna silvestre infectada, comercio (legal e ilegal) de animales silvestres y/o exóticos que actúen como reservorio.
    c. Relacionados con los vectores: zonas de alta concentración de vectores, introducción de vectores infectados (por vehículos o por el viento).
    d. Relacionados con el medioambiente: condiciones climatológicas y geográficas.
    e. Otros: bioterrorismo, escape biológico.
3. **Definir la relación entre cada factor y el riesgo de ocurrencia de la enfermedad**, ya que hay factores de riesgo (su presencia favorece el desarrollo de la enfermedad) y factores protectores (el caso contrario).

4. **Definir la importancia de cada factor** (mediante valores de ponderación o "pesos") en relación con los objetivos descritos y el riesgo de ocurrencia de la enfermedad. Se suele realizar por información encontrada en bibliografía junto con la opinión de expertos.
5. **Estandarizar los factores para hacerlos comparables entre sí**, utilizando la misma escala de valores de riesgo y las mismas unidades geográficas (p.ej. ha, km^2, etc.)
6. **Combinar los factores para producir una estimación ponderada del riesgo final para cada localización del área de estudio**.
7. **Análisis de sensibilidad**. Este punto es imprescindible para evaluar todos los parámetros introducidos en el modelo (*i.e.* factores incluidos y pesos asignados). Permite establecer lo robusto y fiable que es el modelo.
8. **Validación del mapa de riesgo**. Permite comparar el mapa de riesgo obtenido con datos reales sobre la enfermedad, para ver si las estimaciones son acertadas. Para ello, obviamente, es necesario que la enfermedad objeto del estudio ya haya aparecido en la región, por lo que no se puede aplicar este punto del análisis en caso de ser una enfermedad exótica para la zona.

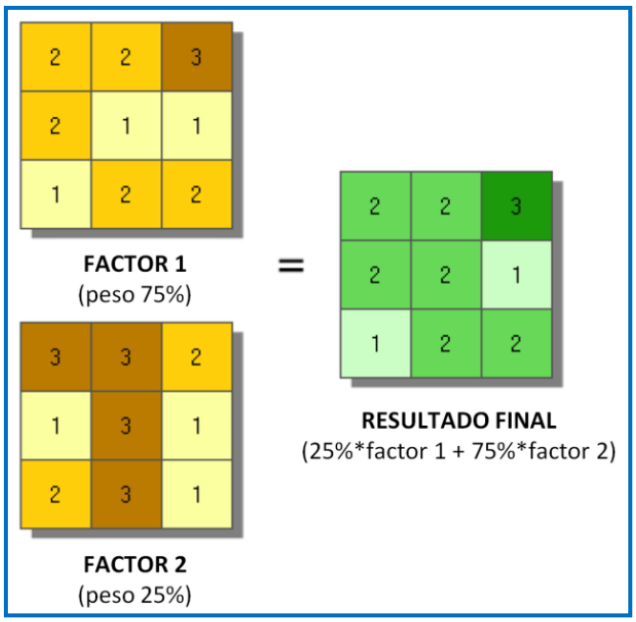


Figura 9. **Ejemplo de aplicación de un modelo de decisión multicriterio.** En este caso se realiza la combinación de valores de dos *input rasters* mediante superposición ponderada para generar un mapa final de riesgo [Fuente: adaptado de ESRI].

A efectos prácticos, consiste en crear un mapa para cada factor en formato *raster* (cuya superficie está dividida en cuadrículas). Cada una de las celdas de estos mapas tendrá asignado un valor para el factor de riesgo. Todos los mapas deberán tener la misma estructura y sus valores deberán estar en la misma escala, para poder ser comparados. Una vez tengamos todos los mapas, las celdas son superpuestas y combinadas para producir un mapa final de riesgo (Figura 9).

Por otro lado, los **análisis estadísticos de agrupaciones (o *clusters*) espaciotemporales** tienen como objetivo identificar patrones de eventos sanitarios en el espacio y el tiempo (Martínez-López *et al.*, 2013a). De esta manera, se pueden identificar las áreas geográficas y los periodos de tiempo en los que el evento ocurre con una proporción inusual dentro de toda la extensión espacial y temporal del estudio (Figura 10). Existen diferentes modelos según los datos de los que se disponga y según los resultados que se pretendan obtener (Martínez-López *et al.*, 2013a). Sin embargo, en ocasiones, los *clusters* detectados puede que no representen brotes reales, por lo que se requiere de estudios epidemiológicos más detallados para determinar la causa de las agrupaciones (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2014b).

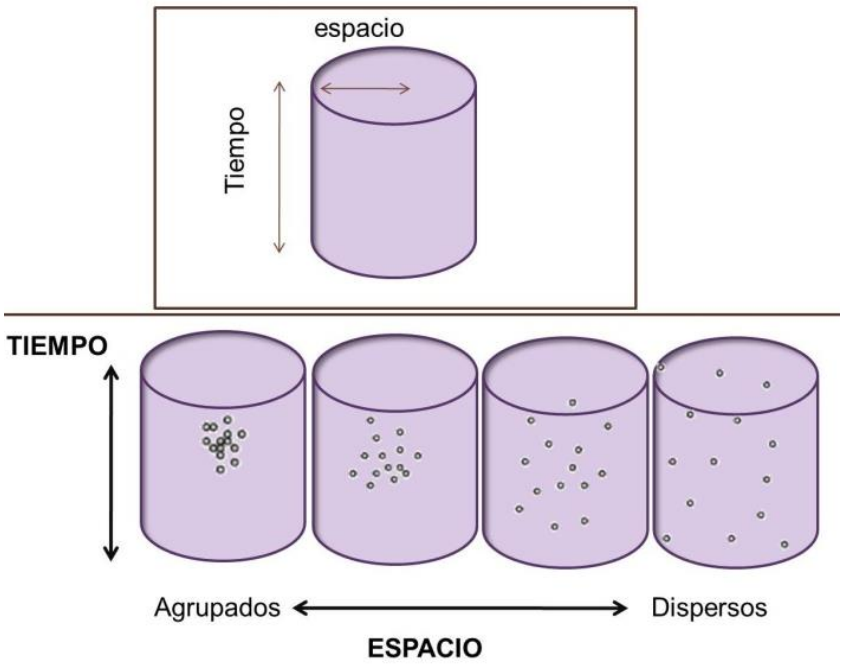


Figura 10. Esquema de los diferentes patrones espaciotemporales integrados en los cilindros de Kulldorf. [Fuente: Martínez-López *et al.*, 2013]

Existe a su vez multitud de **modelos estadísticos con algún componente espacial** que permiten explorar, describir y analizar datos epidemiológicos asociados geográficamente (Elliott *et al.*, 2000b). La estadística espacial tiene una gran importancia, sobre todo en el desarrollo de modelos que determinen los riesgos epidemiológicos a escala espacial (Held y Besag, 1997). Según la experiencia en su uso, el tipo de datos a emplear y la utilidad que se le quiera dar se debe escoger el modelo más adecuado.

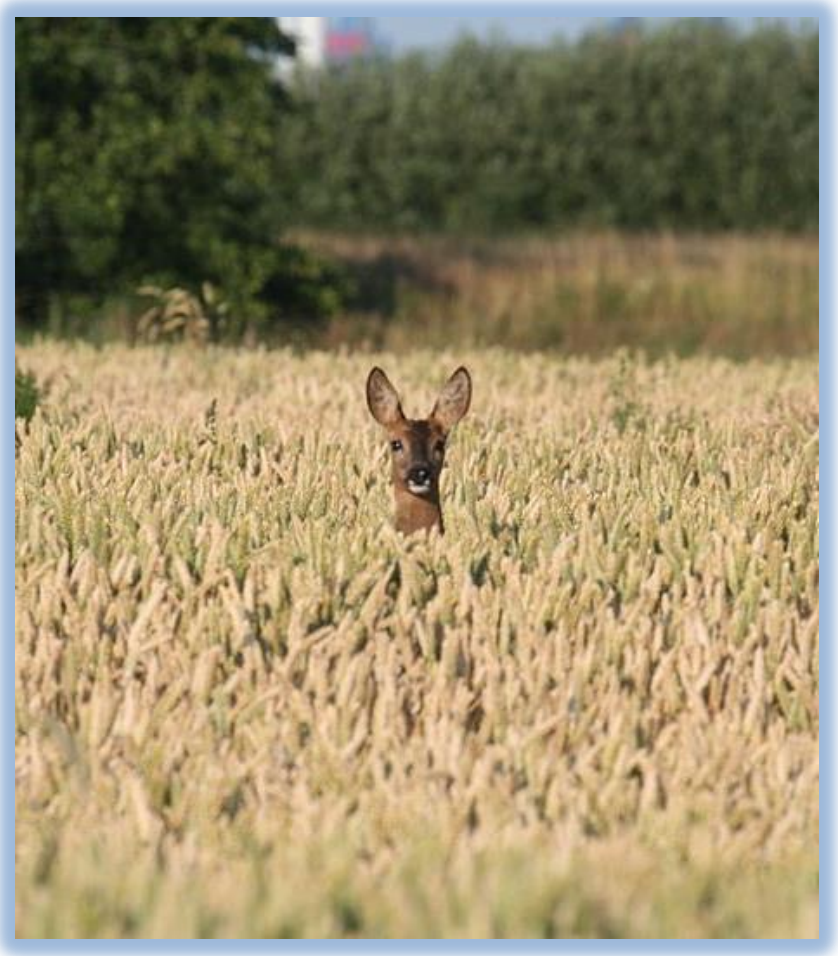
Una de las consideraciones importantes a la hora de elegir el modelo a emplear es ver cómo se distribuyen los datos estadísticos. Es frecuente que en fauna silvestre los datos a utilizar estén de alguna manera agregados, ya sea debido al origen de la información epidemiológica o al tipo de muestreo. Por tanto, no se pueden emplear modelos paramétricos (Boadella *et al.*, 2011). Para superar esta limitación, se pueden emplear **modelos generalizados**, basados en distribuciones de tipo binomial, Poisson o inflado de cero. Por otro lado, los datos epidemiológicos recogidos pueden tener diferentes escalas espaciales (*i.e.* algunos a nivel del animal, mientras que otros son a nivel de explotación o incluso de región). Los **modelos mixtos** permiten analizar todos estos niveles en los que se evita la pseudoreplicación gracias a la inclusión de variables aleatorias (Zuur *et al.*, 2009). Así pues, los **modelos generalizados mixtos** pueden ser un buen punto de partida para detectar asociaciones entre variables con un componente espacial.

Cada vez es más frecuente el empleo de **modelos bayesianos**. Estos modelos consideran el componente aleatorio asociado al modelo, otorgándole una distribución de probabilidad (o *prior*) (Elliott *et al.*, 2000a). En realidad, este componente aleatorio se divide a su vez en dos (Chhetri *et al.*, 2010):

- Un componente estructurado (*i.e.* con cierta distribución espacial). Este componente está asociado con la autocorrelación espacial.
- Otro no estructurado (*i.e.* distribuido de manera aleatoria). En este caso, este efecto aleatorio se introduce para contar con la sobredispersión, que hace referencia a la variabilidad de los datos. Suele ocurrir en poblaciones heterogéneas.

La elección de este tipo de modelos puede ser ventajosa en situaciones en las que existe autocorrelación espacial, potencial dependencia entre las variables, escasez de datos o riesgo de detectar agrupaciones espurias de la enfermedad (Staubach *et al.*, 2002). Además, la creación de matrices de adyacencia (Bernardinelli *et al.*, 1995) permite considerar el riesgo que tiene cada unidad espacial debido a la proximidad con las unidades colindantes (Farnsworth *et al.*, 2006; Osnas *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2014).

En general, la mayor limitación que presenta este tipo de estudios es el **sesgo ecológico** al utilizar fronteras políticas y no naturales o ecológicas para estudiar los eventos de enfermedades (Pfeiffer *et al.*, 2008). Sin embargo, no siempre es posible desagregar los datos a nivel de individuo, lo que además complica cualquier análisis estadístico. Por ello, conviene al menos intentar utilizar la información a la resolución espacial más fina para conseguir las conclusiones más significativas.



2. JUSTIFICACIÓN

Fuente de la imagen: Mucki, 2012 [CC BY-SA 3.0]

2. JUSTIFICACIÓN

Según todo lo dicho anteriormente, el **interés por los animales silvestres** ha ido en aumento en los últimos años. En España, existe una disposición especial en preservar la valiosa biodiversidad faunística. Aunque algunas especies estén en clara expansión, hay poblaciones que se encuentran seriamente influidas por los recientes cambios introducidos en su medio, muchos de ellos de carácter antropogénico. En concreto, en España existen regiones en las cuales coexiste la fauna silvestre con los animales domésticos e incluso los humanos, creándose **situaciones de interacción y potenciales contactos** que conllevan un riesgo de transmisión de patógenos.

Sin embargo, el desconocimiento de la estructura de contactos y transmisión de enfermedades entre y dentro de las poblaciones silvestres se pone de manifiesto normalmente cuando la enfermedad ya está establecida, haciendo que la mayoría de las estrategias de control sean, en la práctica, poco eficaces. Asimismo, pese al mencionado interés científico sobre la fauna silvestre, los cambios recientes en el entorno de la misma y en la manera de entender sus enfermedades, así como las alteraciones en las medidas de manejo del ganado y las concentraciones de animales silvestres hacen difícil la **gestión sanitaria en la interfaz HDS**.

Tampoco hay que olvidar la falta de estudios en el sector que integren conocimientos de epidemiología y microbiología veterinaria, junto con aspectos ecológicos de las poblaciones, para comprender y hacer frente a los contactos producidos entre fauna doméstica y silvestre y su potencial implicación para los humanos. Mediante este **enfoque multidisciplinar** se pretenden estudiar los problemas de la interfaz HDS no solo a nivel de individuos, sino también de explotaciones, unidades de gestión o regiones, lo que permitirá esclarecer los principales factores involucrados en la transmisión de agentes patógenos.

Por otro lado, en ocasiones resulta vital disponer de **herramientas adaptadas para el estudio de la fauna silvestre**, ya que el acceso y la manipulación de estos animales no resultan fáciles y la utilización directa de metodologías puestas a punto para animales domésticos u otras especies similares no siempre garantiza el éxito.

Abarcar todos estos temas desde una perspectiva multifactorial permite poder evaluar las medidas de prevención y control de la transmisión de enfermedades de gran importancia sanitaria y, finalmente, readaptar los **planes de vigilancia y contingencia** que ya están establecidos pero no son del todo efectivos. De esta forma, se podría mejorar la detección precoz y la respuesta rápida frente a un potencial foco.

Para el desarrollo de la presente tesis, se han seleccionado varias enfermedades emergentes y endémicas, algunas de ellas zoonósicas, para el estudio de la interacción entre la fauna doméstica y silvestre, cuyas principales características se resumen en el siguiente cuadro:

<table>
<tr><th>Enfermedad</th><th>Zoonosis</th><th>Hospedadores domésticos diana</th><th>Situación en España</th><th>Fauna silvestre implicada</th><th>Vías de transmisión principales</th></tr>
<tr><td>Enfermedad de West Nile (EWN)</td><td>Sí</td><td>Equinos</td><td>Esporádica en el sur de Andalucía, ausente en el resto del país</td><td>Aves silvestres</td><td>Vectorial (Culex pipiens vector principal)</td></tr>
<tr><td>Enfermedad de Schmallenberg (ESB)</td><td rowspan="3">No</td><td>Rumiantes</td><td>Casos puntuales</td><td>Ungulados silvestres</td><td>Vectorial (Culicoides spp.)</td></tr>
<tr><td>Síndrome respiratorio y reproductor porcino (SRRP)</td><td>Cerdos</td><td rowspan="3">Endémica</td><td>Jabalíes</td><td rowspan="3">Por contacto directo (contaminación ambiental)</td></tr>
<tr><td>Diarrea vírica bovina (DVB)</td><td rowspan="2">Bovinos</td><td>Rumiantes silvestres</td></tr>
<tr><td>Tuberculosis bovina (TB)</td><td>Sí</td><td>Ungulados silvestres</td></tr>
</table>

Mediante la selección de estas enfermedades, se consideran la mayoría de características epidemiológicas mencionadas a lo largo de la introducción. Esto permite la extrapolación de estos estudios a otras enfermedades y regiones con características epidemiológicas similares.

3. OBJETIVOS

Fuente de la imagen: Bill Ebbesen, 2009 [CC BY 3.0]

3. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es el **desarrollo, integración y aplicación de herramientas epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de la fauna silvestre y varias enfermedades infecciosas de la interfaz HDS en España**.

Los **objetivos específicos** (que dan lugar a sus respectivas secciones de resultados) se pueden resumir en los siguientes:

1. Revisar las tendencias de publicación sobre enfermedades infecciosas en fauna silvestre e identificar las especies animales y los patógenos más estudiados en los últimos años.

2. Desarrollar un sistema de vigilancia basado en riesgo para la EWN en Castilla y León mediante un MDMC con el fin de identificar las áreas y los periodos de tiempo de mayor probabilidad de ocurrencia de brotes.

3. Analizar la duración de la inmunidad tanto de ovejas tras la infección natural con el VSB como de su descendencia y valorar la eficacia de la respuesta inmune frente a desafíos experimentales.

4. Caracterizar los factores de riesgo de ocurrencia de TB en la interfaz DS mediante la consideración de variables relacionadas con el ganado, la fauna silvestre y el medioambiente en un modelo espacial bayesiano.

5. Valorar la utilización de dos enfermedades víricas (SRRP y DVB) como marcadores de contacto y transmisión de patógenos en la interfaz DS utilizando técnicas diagnósticas directas e indirectas, así como modelos epidemiológicos para desentrañar factores de riesgo relacionados.

6. Valorar la potencial utilidad de la termografía infrarroja para el estudio de las especies silvestres, tomando como modelo el estudio del patrón térmico de morsas del Pacífico en cautividad.

4. RESULTADOS

Fuente de la imagen: cedida por Joaquín Vicente (IREC)

4. RESULTADOS

Objetivo 1

Revisar las tendencias de publicación sobre enfermedades infecciosas en fauna silvestre e identificar las especies animales y los patógenos más estudiados en los últimos años.

Composición propia. Fuente de las imágenes originales [y, en su caso, licencia]:

1. Libro abierto: adaptación de Alex Proimos, Open Book Policy, 2011 [CC BY-SA 2.0]
2. *Rana muscosa* infectada con *Batrachochytrium dendrobatidis*: Dr. Vance T. Vredenburg (MykoWeb)
3. Zooesporangio de *Batrachochytrium dendrobatidis*: M. L. Johnson, R. Speare, CDC, 2003 [dominio público]
4. Buitres alimentándose de cadáver: Munir Virani, The Peregrine Fund, IUCN-OIE, 2014, Guidelines for wildlife disease risk analysis
5. *Salmo salar*: Hans-Petter Fjeld, 2006 [CC BY-SA 2.5]
6. Virus de la anemia infecciosa del salmón: Alexandra Morton (alexandramorton.typepad.com)
7. *Anas platyrhynchos*: USGS, 2002 [dominio público]
8. Virus de la gripe aviar: adaptación de Cynthia Goldsmith, CDC, 2003 [dominio público]
9. *Amblyomma americanum*: James Gathany, CDC, 2006 [dominio público]
10. *Procyon lotor*: Bastique, 2006 [CC BY-SA 3.0, 2.5, 2.0 y 1.0, GFDL]
11. *Myotis myotis* infectado por el síndrome del hocico blanco: G. Wibbelt *et al*., CDC, 2011 [dominio público]
12. *Geomyces destructans:* G. Wibbelt *et al*., CDC, 2011 [dominio público]
13. Gambas afectadas por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa: B. Gunalan *et al*., 2014 *International Journal of Aquaculture* 4(4), doi: 10.5376/ija.2014.04.0004

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

La relevancia de la sanidad de la fauna silvestre ha cobrado en los últimos años una enorme importancia. Se entiende que la misma, junto con la sanidad de los animales domésticos, la salud pública y la conservación del medioambiente, ayuda a garantizar un correcto estatus sanitario. Por ello, se planteó hacer una **revisión bibliográfica** para centrar cuáles son las especies silvestres y los agentes patógenos que más interés científico han suscitado en los últimos 25 años. Para ello, se realizó la búsqueda de artículos a través de la base de datos de *Thomson Reuters Web of Science*. Tras depurar la base de datos y excluir los artículos que no cumplían con los objetivos, se obtuvieron 4.428 artículos. De cada artículo se extrajo la especie silvestre (o grupo taxonómico) de interés y el patógeno (o grupo de patógenos) objeto de la publicación. El grupo de animales silvestres más representado fue el de los mamíferos (42,64%), seguido de varios grupos de animales silvestres terrestres (16,35%), los peces (13,82%) y las aves (9,62%). Se observó un incremento notable en la tendencia de publicación a lo largo del periodo de estudio, con un aumento muy evidente desde 2009. Esto podría explicarse por el reciente interés en la sanidad de los animales acuáticos (*i.e.* peces, crustáceos y moluscos) y la aparición de ciertos patógenos emergentes, como el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* que afecta a los anfibios o varias especies de bacterias. Esta revisión concluye destacando la necesidad de estudio de las enfermedades infecciosas en los animales silvestres, por su potencial impacto sobre sus propias poblaciones, la sanidad de los animales domésticos y silvestres y la salud pública.

Publicación principal de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Goyache, J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en preparación). **Revisión de la evolución en el estudio de las enfermedades infecciosas en la fauna silvestre**.

Fuente de las imágenes de los animales silvestres incluidas en la Figura 2: de cada foto se indica el autor o institución a la que pertenece y el año de publicación; tras el guion, se especifica si son de dominio público o sin tienen alguna licencia asociada, generalmente de *Creative Commons* (CC) o *GNU Free Documentation License* (GFDL):

Meles meles (BadgerHero, 2003 - CC BY-SA 3.0, GFDL); *Odocoileus virginianus* (Scott Bauer, USDA, 2006 – dominio público); *Anas plathyrhyncos* (Anton Holmquist Soasta, 2008 - CC BY-SA 3.0, GFDL); *Gyps fulvus* (Calo Bescós, 2005 - CC BY-SA 3.0, GFDL); *Litoria subglandulosa* (LiquidGhoul, 2008 - CC BY-SA 3.0, GFDL); *Salamandra salamandra* (Didier Descouens, 2012 - CC BY-SA 3.0); *Chelonia mydas* (Brocken Inaglory, 2005 - CC BY-SA 3.0, GFDL); Sphenodon punctatus (Wikimedia Commons, 2006 – dominio público); *Bombus* sp. (Wikimedia Commons, 2006 - CC BY-SA 2.5); *Myrmica* sp. (Sarefo, 2009 - CC BY-SA 3.0, 2.5, 2.0 y 1.0, GFDL); *Aedes albopictus* (CDC, 2001 – dominio público); *Ixodes ricinus* (Wwalas, 2008 - CC BY-SA 3.0, 2.5, 2.0 y 1.0, GFDL); *Salmo salar* (Hans-Petter Fjeld, 2006 - CC BY-SA 2.5); *Oreochromis niloticus* (W.A. Djatmiko, 2007 - CC-BY-SA-3.0, 2.5, 2.0 y 1.0, GFDL); *Litopenaeus vannamei* (USDA, 2007 – dominio público); *Macrobrachium rosenbergii* (Jarek Tuszynski, 2009 - CC-BY-SA-3.0, GDFL); *Crassostrea gigas* (David Monniaux, 2005 - CC BY-SA 3.0 y 2.0, GFDL); *Mytilus edulis* (Erik Veldhuis, 2008 - CC-BY-SA-3.0, GDFL).

REVISIÓN DE LA EVOLUCIÓN EN EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LA FAUNA SILVESTRE

V. Rodríguez-Prieto[1], J. Goyache[1] y J. M. Sánchez-Vizcaíno[1]

[1] Centro VISAVET, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid
Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España.

El concepto *One Health* está experimentando un resurgimiento importante, ya que se ha estado desarrollando en la actualidad una gran concienciación acerca del impacto sanitario que conllevan las complejas relaciones entre el ser humano, los animales domésticos, la fauna silvestre y el medioambiente (Kahn *et al.*, 2007; Kaplan *et al.*, 2009; Zinsstag *et al.*, 2011). Los animales silvestres juegan un papel especial dentro de esta "única salud" por la interacción epidemiológica con el ganado y por el impacto sobre la salud pública (Turner *et al.*, 2013). Asimismo, un gran esfuerzo de investigación se ha dirigido en las últimas décadas a comprender el efecto ecológico de las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre y su efecto no solo sobre individuos, sino sobre sus poblaciones (Tompkins *et al.*, 2011).

Todo esto ha promovido el estudio de la fauna silvestre, sobre todo desde 2000, como ya se había anotado con anterioridad (Gortázar *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2013). Sin embargo, no se conoce ningún estudio que centre cuáles son las especies silvestres y los agentes patógenos que más interés científico han suscitado. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en realizar una **búsqueda bibliográfica** para conocer las tendencias recientes en el interés científico sobre las enfermedades infecciosas en los animales silvestres.

La búsqueda bibliográfica se realizó a través de la base de datos de la ***Thomson Reuters Web of Science*** (previamente conocida como *ISI Web of Knowledge*) el día 18 de mayo de 2014. El **periodo de tiempo** considerado fueron los últimos 25 años (*i.e.* desde 1990 hasta la fecha de realización de la búsqueda). Como campo de búsqueda se utilizó el **tema** de los artículos, que incluye título, resumen, palabras clave y *KeyWords Plus*® (palabras clave asignadas a cada artículo por editores especialistas de *Thomson Reuters* según su contenido). Como términos de búsqueda, se seleccionaron los operadores booleanos *wildlife*, *infectious disease*, *prion*, *virus*, *bacteria*, *fungus* y *parasite*. De este modo, se realizó la búsqueda en seis tandas (*i.e.* combinando *wildlife* con cada uno de los términos relativos a enfermedades infecciosas).

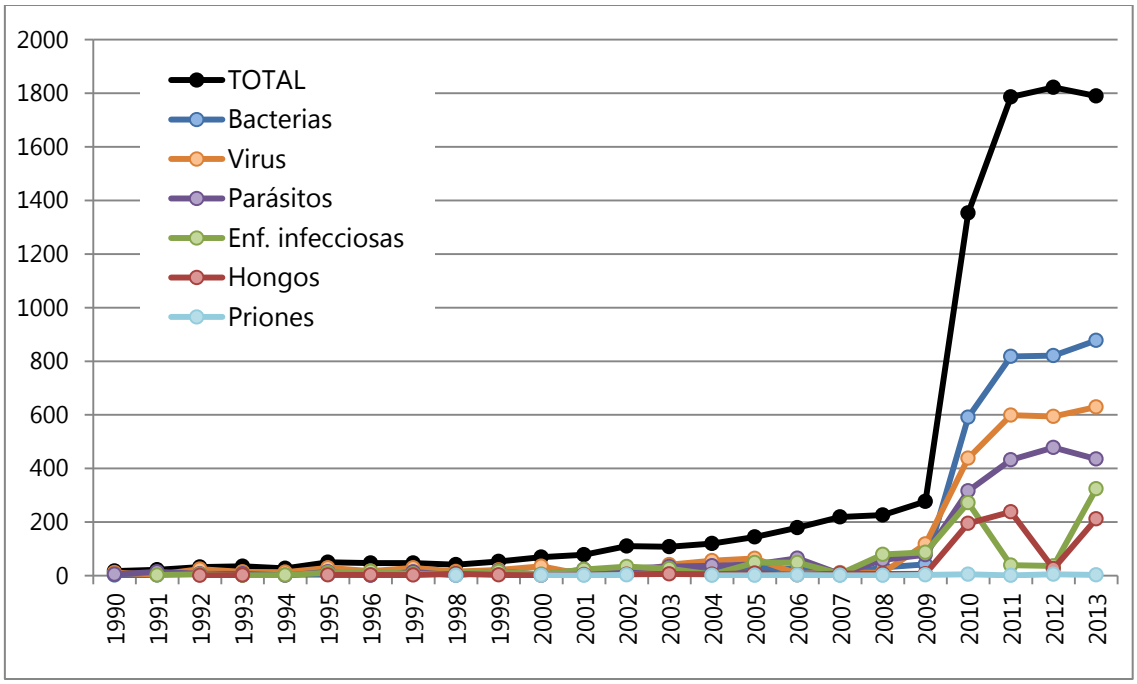


Figura 1. Evolución en el número de publicaciones científicas relacionadas con la fauna silvestre y las enfermedades infecciosas. Para ello, se realizó una búsqueda en la base de datos de la *Thomson Reuters Web of Science* en los años 1990-2013. Se utilizó la combinación del término *wildlife* ("fauna silvestre") con *infectious disease* ("enfermedad infecciosa", en verde), *prion* (en turquesa), *virus* (en naranja), *bacteria* (en azul oscuro), *fungus* ("hongo", en rojo") o *parasite* ("parásito", en morado). En negro se muestra el conjunto de todas las categorías anteriores, excluyendo los artículos duplicados. El año 2014 se excluyó de la gráfica ya que no se había completado aún en el momento de realización de la búsqueda bibliográfica.

Se identificaron un total de 9.123 artículos científicos en todo el periodo (*i.e.* 1990-2014). Como se puede apreciar en la Figura 1, empieza a haber un ligero aumento en el número de publicaciones desde finales de los 90, pero el pico evidente en todas las disciplinas se produce a partir de 2009. De hecho, 7.499 artículos (82,20%) se publicaron a partir de este año. ¿Qué ha fomentado este disparo en el interés científico por las enfermedades infecciosas y la fauna silvestre?

Para intentar descifrar este hecho, se depuró la base de datos, en primer lugar eliminando todos los artículos duplicados. A continuación, se extrajeron de los artículos (mediante lectura de título, resumen y, en los casos necesarios, el texto del manuscrito) el **agente patógeno** implicado (o grupo taxonómico) y la **especie de animal silvestre** implicada (o grupo taxonómico). Se crearon además las categorías "Fauna silvestre terrestre" y "Fauna silvestre acuática" para aquellos artículos que o bien eran genéricos para este tipo de animales, o bien abarcaban especies de varios de los grupos. Asimismo, se creó la categoría genérica "Patógenos".

Fueron excluidos aquellos artículos que se enfocaban en animales domésticos o criados, ya que están de alguna manera sometidos a la acción del hombre, así como los artículos relacionados con plantas. Por otro lado, no se tuvieron en cuenta artículos relacionados con infecciones experimentales, desarrollo de vacunas o técnicas diagnósticas, efecto de contaminantes, probióticos, suplementación dietética, etc. De esta forma solo se consideraron en el análisis artículos relacionados con **infecciones o infestaciones en animales silvestres**, incluyendo un total de 4.428 artículos (Figura 2).

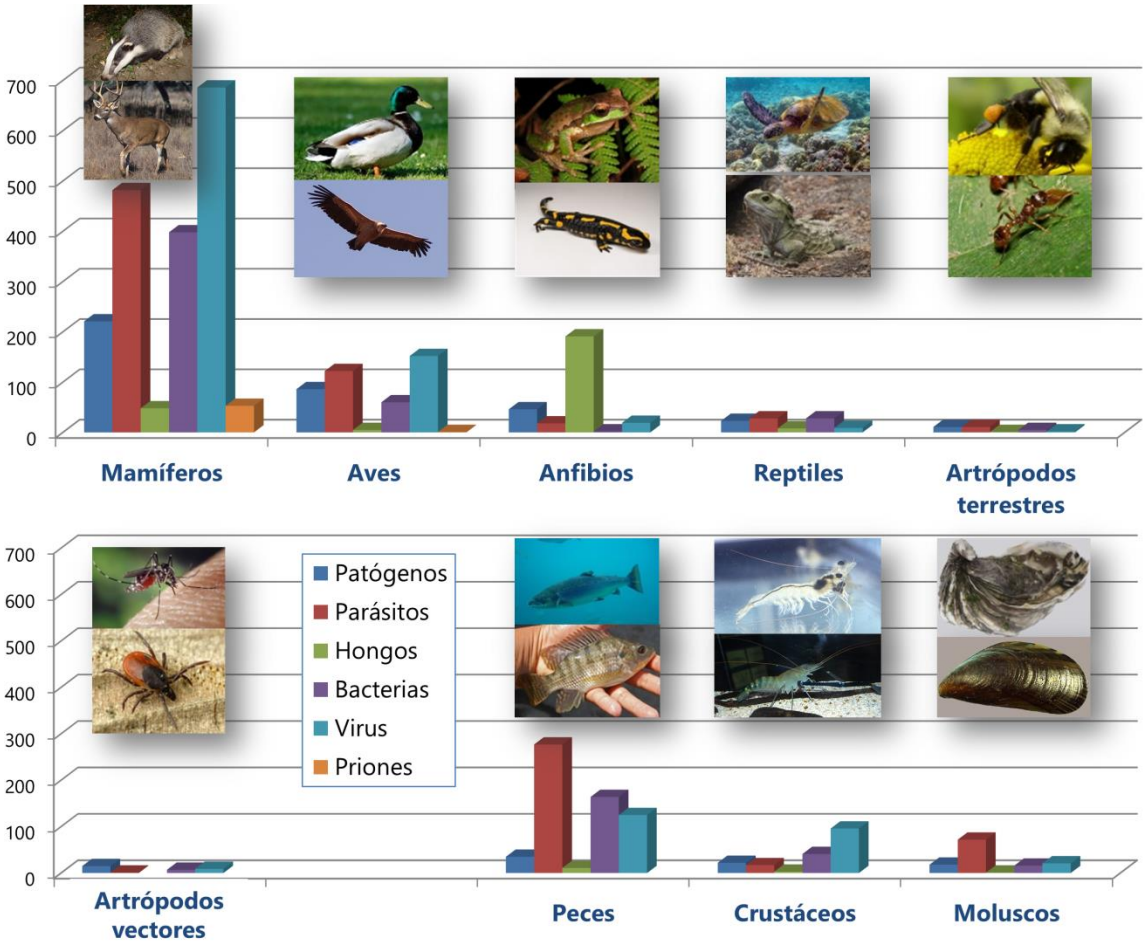


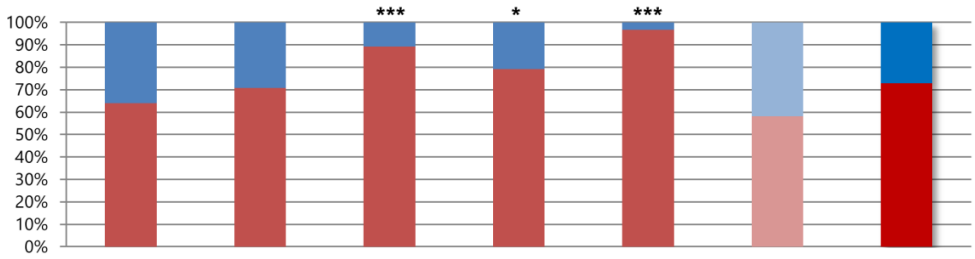
Figura 2. Frecuencia de artículos relacionados con infecciones o infestaciones de animales silvestres por grupo taxonómico. Las fotos incluidas en el gráfico corresponden a (de arriba abajo, de izquierda a derecha): tejón común (*Meles meles*), ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), ánade real (*Anas plathyrhyncos*), buitre leonado (*Gyps fulvus*), rana arborícola de Nueva Inglaterra (*Litoria subglandulosa*), salamandra común (*Salamandra salamandra*), tortuga verde (*Chelonia mydas*), tuátara (*Sphenodon punctatus*), abejorro (*Bombus* sp.), hormiga (*Myrmica* sp.), mosquito tigre (*Aedes albopictus*), garrapata común (*Ixodes ricinus*), salmón atlántico (*Salmo salar*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*), cangrejo de río gigante (*Macrobrachium rosenbergii*), ostión (*Crassostrea gigas*) y mejillón (*Mytilus edulis*). No se han incluido en la figura las categorías genéricas "Fauna silvestre terrestre" y "Fauna silvestre acuática" [Fuente de las imágenes: ver página 64].

Tal y como se observa en la Figura 2, el grupo de animales más representado es el de los mamíferos, con más de un 42% de los artículos relacionados (n=1.888). En la segunda posición se coloca el grupo de fauna silvestre terrestre, con 724 artículos (16,35%). Los peces ocupan el tercer puesto, con 612 artículos (13,82%), seguido por las aves, con 426 (9,62%). El resto de grupos no están tan ampliamente representados. Sin embargo, cabe destacar que de los 276 artículos relacionados con **anfibios**, casi el 70% de los mismos (n=191) están relacionados con el hongo emergente *Batrachochytrium dendrobatidis*. Asimismo, prácticamente la totalidad de artículos relacionados con **priones** se asocian con mamíferos (principalmente cérvidos) mientras que el resto de patógenos se distribuyen de maneras diversas en los distintos grupos taxonómicos. Sin embargo, las tendencias de publicación han ido variando con el tiempo (Figura 3).

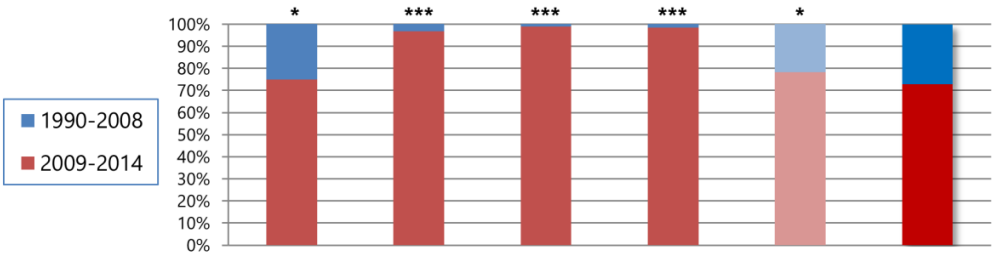
Respecto a los **mamíferos** (Tabla 1), el grupo más ampliamente representado es el de los **artiodáctilos** (n=449) que supone más de un 10% de todos los artículos analizados. Los rumiantes son los más relevantes (n=355) presentando asociación con una gran variedad de patógenos bacterianos (como *Brucella* spp. o *Mycobacterium bovis*), virus (destacando la diarrea vírica bovina, la fiebre aftosa y la lengua azul) y priones (por la enfermedad debilitante crónica). Por otro lado, 83 publicaciones tratan de patógenos de suinos, sobre todo virus (principalmente el de la peste porcina clásica) y bacterias (destacando *M. bovis*). Los **carnívoros** ocupan el siguiente puesto dentro de los mamíferos (n=402) abundando las publicaciones acerca de los caniformes (n=287). En este taxón, tres son los patógenos que destacan sobre los demás: el virus de la rabia, *M. bovis* y nuevas cepas de morbilivirus. El interés por todas estas especies se observa desde el principio del estudio (1990) hasta el final.

Sin embargo, dos taxones despuntan sobre todo a partir de 2009: los **primates** (n=84 de 115) y los **quirópteros** (n=90 de 106). Respecto al primer grupo, se han estudiado variedad de patógenos, aunque los más representados son los parásitos (sobre todo los gastrointestinales). En cuanto a los quirópteros, cabe mencionar la abundancia de artículos relacionados con el síndrome de la nariz blanca ocasionado por el hongo recientemente descubierto *Pseudogymnoascus destructans*, anteriormente conocido como *Geomyces destructans* (Lorch *et al.*, 2011) así como varios virus emergentes (principalmente del género *Lyssavirus*).

PERIODOS	Mamíferos	Aves	Anfibios	Reptiles	Artrópodos terrestres	Fauna silvestre terrestre	Total
1990-2014	1.888	426	276	96	30	724	4.428
2009-2014	1.207	301	246	76	29	421	3.229
%2009-2014	63,93%	70,66%	89,13%	79,17%	96,67%	58,15%	**72,92%**



PERIODOS	Artrópodos vectores	Peces	Crustáceos	Moluscos	Fauna silvestre acúatica	Total
1990-2014	32	612	179	128	37	4.428
2009-2014	24	593	177	126	29	3.229
%2009-2014	75,00%	96,90%	98,88%	98,44%	78,38%	**72,92%**



PERIODOS	Patógenos	Parásitos	Hongos	Bacterias	Virus	Priones	Total
1990-2014	815	1.229	273	860	1.197	54	4.428
2009-2014	564	905	248	728	750	34	3.229
%2009-2014	69,20%	73,64%	90,84%	84,65%	62,66%	62,96%	**72,92%**

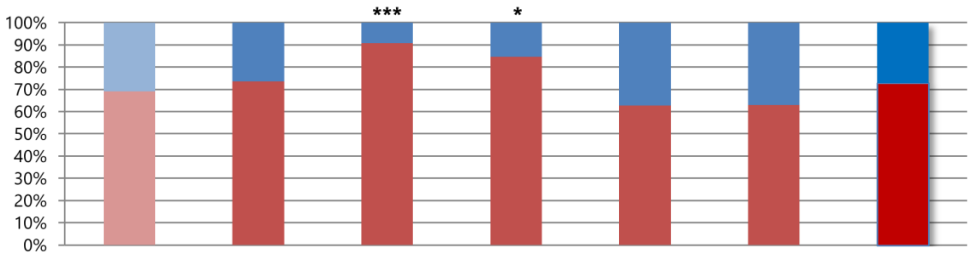


Figura 3. Comparativa de los artículos relacionados con enfermedades infecciosas de fauna silvestre publicados antes y después de 2009. En las tablas se muestran, por grupo de animal silvestre y por grupo de patógeno, el número de publicaciones en todo el periodo, así como las cifras y los porcentajes de artículos publicados a partir de 2009 (incluido) con el porcentaje que suponen. En las gráficas se comparan los artículos publicados antes (en azul) y después de 2009 (en rojo). Los asteriscos marcan aquellos grupos en los que se ha notado un incremento notable (*) o muy notable (***) de publicaciones a partir de 2009 en comparación con el total.

En esta revisión se han recogido al menos **250 enfermedades o patógenos que afectan a los mamíferos**, de los cuales 121 han sido estudiados por primera vez a partir del año 2009. Las enfermedades más representadas se indican en la Tabla 1.

Respecto a las **aves**, los artículos tratan sobre una gran variedad de especies, siendo los órdenes más representados las **paseriformes** (n=80, con representantes de 18 familias), las **galliformes** (n=40), las **rapaces** (*i.e.* falconiformes y estrigiformes, n=37) y las **anseriformes** (n=25). Sin embargo, una gran proporción de artículos (*i.e.* más del 30%) tratan sobre especies de varios órdenes distintos (p.ej. aves acuáticas), por lo que un análisis pormenorizado por taxón resultaría muy ambicioso.

Tabla 1. Lista de las enfermedades infecciosas de mamíferos y aves más representadas en la revisión bibliográfica. Se indica el recuento de artículos en todo el periodo (*i.e.* 1990-2014) y en los últimos 5 años, así como el porcentaje que estos últimos suponen sobre el total. En rojo y negrita quedan destacadas aquellas enfermedades que se han publicado primordialmente en los últimos años (*i.e.* cuyo porcentaje es mayor que el del total de publicaciones, 72.92%).

	Enfermedad	Tipo de patógeno	1990-2014	2009-2014	%2009-2014
Mamíferos	**Rabia**	Virus	258	99	38,37%
	Tuberculosis bovina	Bacteria	146	118	**80,82%**
	Triquinelosis	Parásito	55	29	52,73%
	Brucelosis	Bacteria	53	49	**92,45%**
	Enfermedad debilitante crónica	Prion	52	33	63,46%
	Fiebre aftosa	Virus	52	28	53,85%
	Toxoplasma gondii	Parásito	42	32	**76,19%**
	Síndrome del hocico blanco	Hongo	40	40	**100,00%**
Aves	**Influenza aviar**	Virus	58	45	**77,59%**
	Hemosporidiosis (malaria aviar)	Parásito	49	33	67,35%
	Enfermedad de West Nile	Virus	43	20	46,51%
	Conjuntivitis por micoplasmas	Bacteria	12	8	66,67%
	Enfermedad de Newcastle	Virus	12	7	58,33%
	Infección por poxvirus	Virus	12	10	**83,33%**
	Salmonelosis	Bacteria	10	7	70,00%
	Escherichia coli	Bacteria	8	6	**75,00%**

En total, se han encontrado **66 enfermedades o grupos de patógenos relacionados con las aves**, de los cuales más de la mitad (*i.e.* 35) han sido incluidos por primera vez en los últimos cinco años. Las enfermedades más representadas están indicadas en la Tabla 1.

Los patógenos más frecuentemente estudiados en las aves son los virus (n=152). Parece obvio que los dos más representados sean el virus de la gripe aviar y el virus de West Nile, responsables de graves epidemias de los últimos años. Asimismo, también hay una gran cantidad de artículos sobre parásitos (n=122) destacando los parásitos sanguíneos responsables de la malaria aviar. Las bacterias no quedan tan representadas dentro de las aves (n=60) aunque destacan la clamidiosis, la conjuntivitis por micoplasmas y la salmonelosis como enfermedades más relevantes (sobre todo en los últimos años).

Un hallazgo curioso de esta revisión es el elevado número de publicaciones sobre **animales acuáticos** (n=956), en concreto **peces**, **crustáceos** y **moluscos**. El interés por estas especies se ha disparado en los últimos años. De hecho, 96% de los artículos pertenecientes a estas categorías se publicaron a partir de 2010. Tal y como destaca la Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2008), la obtención de productos de animales acuáticos ha adquirido una tendencia creciente debido al incremento de la población, unido al creciente aumento en el consumo *per capita* de pescado para poder suplir la demanda internacional de proteína de origen animal. De hecho, estudios de la FAO indican que se ha alcanzado el techo de aprovechamiento de la pesca extractiva, por lo que los incrementos en la producción de productos pesqueros solo podrán provenir de la acuicultura, sector que está experimentado un desarrollo espectacular. Aunque los artículos que trataban expresamente sobre acuicultura han sido excluidos de esta revisión (debido al efecto directo que tiene el hombre sobre los mismos) este interés por el medio acuático podría explicar el gran número de publicaciones sobre este tema. Asimismo, también queda demostrado por el gran número de líneas de investigación relacionadas con el medio marino que pretende impulsar la iniciativa europea *Horizon 2020* (CE, 2014).

Dentro de las publicaciones relacionadas con **peces**, los parásitos ocupan un interés especial (n=277) tratando sobre una inmensa variedad de especies, tanto clásicas como recientemente descritas. También se encontraron numerosas publicaciones acerca de bacterias (n=164, principalmente los géneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Streptococcus* y *Mycobacterium*) y virus (n=125, principalmente los agentes causantes de la septicemia hemorrágica vírica, la necrosis pancreática infecciosa y la anemia infecciosa de los salmónidos).

En cuanto a los **crustáceos** (n=179), los patógenos más representados fueron los virus (n=96) sobre todo el causante del síndrome de las manchas blancas. En cuanto a los **moluscos**, los agentes que aparecen con más frecuencia son los parásitos de los géneros *Bonamia* y *Perkinsus*, así como el herpesvirus de los ostreidos tipo 1. En ambos grupos también hay un número relevante de publicaciones acerca de bacterias del género *Vibrio*.

Tras esta revisión, queda patente que el ámbito de la investigación en animales silvestres y enfermedades infecciosas está en clara expansión, sobre todo desde 2009 (Figura 3). Este creciente interés se podría explicar tanto por la recurrencia de ciertos agentes patógenos endémicos y el reciente surgimiento de enfermedades nuevas, exóticas y reemergentes (Mörner *et al.*, 2002; Kuiken *et al.*, 2011) como por el incremento de notificaciones de brotes en humanos asociados a patógenos de fauna silvestre (Dobson y Foufopoulos, 2001; Ostfeld y Holt, 2004; Decker *et al.*, 2010).

Ejemplos de estas situaciones han quedado reflejados claramente en esta revisión. De hecho, los patógenos asociados con la fauna silvestre podrían agruparse en tres grupos según el impacto que provocan:

- Por el **impacto sobre sus poblaciones** (p.ej. la quitridiomicosis en anfibios, el síndrome de la nariz blanca de los murciélagos o la malaria aviar).
- Por el **impacto sobre la salud pública** (p.ej. la rabia, la gripe aviar, la enfermedad de West Nile o la leptospirosis).
- Por el **impacto sobre la sanidad de los animales domésticos** (p.ej. la fiebre aftosa, la brucelosis o la tuberculosis bovina).

Esta revisión pone de manifiesto la gran variedad de amenazas sanitarias asociadas a la fauna silvestre, así como la implicación de múltiples especies repartidas por todo el mundo en la transmisión de enfermedades de la interfaz humano-doméstico-silvestre. Por todo ello, la gestión sanitaria de las enfermedades infecciosas, tanto las endémicas como las emergentes, solo puede ser eficaz si se concibe y aplica de una manera integral sobre todos los componentes.

Objetivo 2

Desarrollar un sistema de vigilancia basado en riesgo para la EWN en Castilla y León mediante un MDMC con el fin de identificar las áreas y los periodos de tiempo de mayor probabilidad de ocurrencia de brotes.

Composición propia. Fuente de las imágenes originales:

1. Cartógrafo: Jorge Vila (dihargentina.blogspot.com)
2. Caballos: Yeguada Antonio Moreta (www.yeguada-antoniomoreta.com)
3. Aves: Ricardo Natalichio (www.ecoportal.net)
4. Mosquito: Jim Gathany, CDC, 2003 [dominio público]

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

La introducción y la rápida difusión del **virus de West Nile** (VWN) en nuevas regiones como el continente americano, así como la reemergencia de la enfermedad en la Cuenca Mediterránea han puesto en evidencia la necesidad de mejorar los sistemas de prevención y control de cara a futuras incursiones del virus. De hecho, esta necesidad está fomentada por el creciente número de casos en humanos, équidos y aves en los últimos años, asociado a brotes severos. Los brotes en équidos ocurren generalmente bajo unas condiciones climáticas y medioambientales específicas y, típicamente, antes de que se detecten casos en humanos. Por lo tanto, puede resultar ventajoso enfocar las estrategias de vigilancia en áreas y periodos de tiempo de alta probabilidad de ocurrencia de brotes del VWN. Así, se podría establecer un sistema de detección precoz de cara a prevenir la enfermedad tanto en équidos como en humanos. En este trabajo se utilizó un modelo espacial para identificar las áreas y periodos de tiempo de riesgo para la enfermedad de West Nile (EWN) en Castilla y León, que alberga un sector equino importante a nivel nacional. Para ello, se extrajeron datos sobre densidad de équidos, abundancia de aves silvestres y factores climáticos y ambientales relacionados con el vector principal, el mosquito *Culex pipiens*. Estos factores se mapearon y superpusieron para finalmente crear mapas de riesgo mensuales, así como un mapa para el periodo global. De esta forma, se obtuvieron unas zonas de mayor probabilidad de ocurrencia de brotes repartidas por todas las provincias, siendo los meses de julio y agosto los de mayor riesgo. Además, los mapas obtenidos se compararon con las zonas de vigilancia en équidos contempladas en el programa vigente hasta el momento, así como con los municipios de mayor población humana, para extraer las zonas en las que deberían reforzarse las medidas sanitarias. Los métodos y resultados que se presentan a continuación han ayudado a mejorar los programas de vigilancia de dicha comunidad autónoma, y podrían servir tras su adaptación para mejorar la detección precoz y el control de brotes de esta y otras enfermedades vectoriales en España y otras regiones con características epidemiológicas similares.

Publicación principal de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Martínez, M., Muñoz, M. J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Identification of suitable areas for West Nile virus outbreaks in equid populations for application in surveillance plans: the example of the Castile and Leon region of Spain**. *Epidemiology and Infection* 140(9), 1617-1631.

Aportaciones científicas relacionadas

➢ *Trabajo fin de máster*

- Rodríguez Prieto, V. (2010). **Identificación de zonas de riesgo de difusión de la fiebre del Nilo Occidental en Castilla y León**. Trabajo Fin de Máster de Investigación en Ciencias Veterinarias. Tutorizado por el Dr. J. Goyache Goñi y el Dr. J. M. Sánchez-Vizcaíno.

➢ *Publicaciones científicas de divulgación*

- Rodríguez, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2010). **West Nile. Algunos puntos de interés**. *Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA)*. Disponible *online* en: http://www.colvema.org/WV_descargas/RepasoWN-30112010114455.pdf (último acceso: 10 de julio de 2014).
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Rodríguez, V. y Martínez-López, B. (2011). **Guía práctica de West Nile**. *Boletín de la Asociación Española de Veterinarios Especialistas en Équidos (AEVEE)*, 2º trimestre de 2011.

➢ *Congresos*

- Rodríguez, V., Martínez, B. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2010). **Identificación de las zonas de riesgo de difusión de la fiebre del Nilo Occidental (West Nile) en Castilla y León**. Póster en el *II Congreso Ibérico de Epidemiología Veterinaria*, Facultad de Veterinaria de la UAB, Barcelona.
- Rodríguez, V., Martínez, B. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2011). **Aplicación de la riesgo-vigilancia a la enfermedad de West Nile en España**. Comunicación oral en el *X Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Medicina de la UCM, Madrid.

➢ *Ponencias*

- Rodríguez, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Aspectos generales de la enfermedad de West Nile**. Ponencia en la *Jornada Técnica de West Nile*, Ilustre Colegio de Veterinarios de Sevilla (COLVETSE), Sevilla.

Epidemiol. Infect., Page 1 of 15. © Cambridge University Press 2011
doi:10.1017/S0950268811002366

Identification of suitable areas for West Nile virus outbreaks in equid populations for application in surveillance plans: the example of the Castile and Leon region of Spain

V. RODRÍGUEZ-PRIETO[1]*, B. MARTÍNEZ-LÓPEZ[1], M. MARTÍNEZ[1,2], M. J. MUÑOZ[2] AND J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO[1]

[1] *VISAVET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain*
[2] *Epidemiology and Environmental Health Department, Animal Health Research Center of the National Institute of Agriculture and Food Research and Technology (CISA-INIA), Valdeolmos, Madrid, Spain*

(*Accepted 1 November 2011*)

SUMMARY

The introduction and rapid spread of West Nile virus (WNV) into new areas such as the American continent, associated also with the severity of the disease in humans and equids has increased concerns regarding the need to better prevent and control future WNV incursions. WNV outbreaks in equids usually occur under specific climatic and environmental conditions and, typically, before detection of WNV cases in humans. Targeting surveillance strategies in areas and time periods identified as suitable for WNV outbreaks in equids may act as an early-warning system to prevent disease in both equids and humans. This study used a GIS-based framework to identify suitable areas and time periods for WNV outbreak occurrence in one of the most important areas of equid production in Spain, i.e. Castile and Leon. Methods and results presented here may help to improve the early detection and control of future WNV outbreaks in Spain and other regions.

Key words: West Nile, risk mapping, target surveillance, weighted linear combination, Spain.

INTRODUCTION

West Nile (WN) is a notifiable vector-borne, zoonotic disease caused by the WN virus (WNV) with worldwide distribution. This flavivirus can replicate in a great number of bird, reptile, amphibian and mammal species, and has been isolated in at least 75 species of mosquitoes [1–3]. This wide range of potential susceptible species makes WNV the most widely spread arbovirus in the world, being present in all continents, except the Antarctic [4]. Despite this widespread presence, clinical disease has been reported only in a few species, mainly humans, equids and many species of birds [5, 6]. The role of these hosts in WN epidemiology is very diverse. Many species of birds act as WNV reservoirs, not presenting clinical signs and amplifying WNV, spread by bird–vector–bird transmission. Conversely, humans and equids may present severe clinical symptoms but are 'dead-end' or incidental hosts, as they are not known to develop an infectious level viraemia [5, 7].

As an example, in the USA, where WNV was first introduced in 1999, a total of 2036 cases in equids and 10 764 cases in humans have been reported over the last 5 years (2006–2010), with an enormous sanitary

* Author for correspondence: Mr V. Rodríguez-Prieto, VISAVET Centre and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.
(Email: victor@sanidadanimal.info)

and economic impact in the country [CDC database, (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm); USDA database, (http://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/equine/wnv/)]. Traditionally the consequences have not been so devastating in Europe, probably because the virus has been circulating for many decades (i.e. not a naive population as in the USA), and has produced sporadic and limited outbreaks in humans and equids separated by long periods of epidemiological inaction [7]. However, since 1996, WNV virulence seems to have increased, mainly in the Mediterranean basin, with an increase in the number of reported outbreaks in humans and/or equids [4, 5, 8]. Example of this are the outbreaks reported in Morocco (1996–2003, 2010), Italy (1998, 2008–2009, 2010), Israel (1998–1999, 2000), France (2000, 2003–2004–2006), Portugal (2004, 2010), Greece (2010) and Spain (2004, 2010) [8, OIE-WAHID (www.oie.int/wahid-prod/public.php)].

Outbreaks of WNV in equids usually occur under specific climatic and environmental conditions and, typically, before detection of human WN cases, which could be used as an early-warning system for the public health authorities [9, 10]. Obviously, such conditions directly influence the abundance of potential vectors and the presence of amplifying birds (i.e. those birds with high levels of viraemia). The most common vector of WNV in Europe is the ornitophilic mosquito *Culex pipiens*. Although there are no counts of *Culex* spp. for European countries, it is known that its presence is mainly related to factors such as distance from aquatic areas, temperature and rainfall [11, 12]. In fact, bodies of water in which vector and bird populations are abundant constitute an ideal setting for WNV spread, and have indeed been linked with WNV circulation [8].

The continuous progress in spatial remote sensing and other geospatial technologies has opened new horizons for spatial analysis. Maps containing information on climatic and environmental factors can be integrated in geographical information systems (GIS) in order to estimate suitable areas for human and animal diseases, being particularly useful for vector-borne diseases [13]. One of the simplest and most frequently used ways of combining input (or factor) maps to produce suitability maps is weighted linear combination (WLC) [14]. This method allows the combination of several input or factor maps and the assigning of weights to account for the relative importance of each factor. The basic steps used in WLC are (1) to standardize the scores of the input maps and compare all these layers on a common scale, (2) to apply weights to input maps and (3) to obtain the final risk map by calculating a weighted average across factors for each 1 km² pixel. This GIS-based framework with WLC has been previously used, for example, to identify high-risk areas for Rift Valley fever in Africa [15]. In the current study we will use this approach to explore highly suitable areas for WNV outbreaks in equid populations.

The climatic and biogeographical characteristics of Spain allow a great diversity of distinct ecosystems and biological habitats, which favours not only the presence of a great number and biodiversity of vertebrates, especially birds, both resident and migratory, but also a high abundance of mosquitoes. In fact, the southerly position of Spain, in the Palaearctic, favours the reception of a large bird population that migrate from Europe to Africa and vice versa, acting as a wintering quarter for many North European aquatic birds and as an important northern breeding area for other birds like raptors and *Passeriformes*, which winter in Africa. Some of these birds are able to migrate not only from Morocco, where WNV outbreaks in equids were notified in 2010 (OIE-WAHID), but also from sub-Saharan locations such as Senegal where WNV is endemic [6, 16] (Fig. 1). These factors, together with the re-emergence of WNV in neighbouring countries such as Portugal or France, the recent outbreaks of WNV in southern Spain, the experience gained with other vector-borne diseases such as bluetongue and, the high density of equids in certain regions of Spain has increased the concerns of the Spanish Animal and Public Health authorities regarding the potential sanitary and economic consequences of a WNV incursion into Spain. Specifically, Castile and Leon (C&L), located in the north-central part of country, is the largest region in Spain and hosts favourable conditions for the establishment of WNV, as well as a large and valuable population of equids. In fact, C&L is the third largest producer of equids, concentrating 12·19 % of the total equid population of Spain [INE database (http://www.ine.es)].

Although WNV infection in Spain has been suspected since 1979 [17], its presence has been confirmed in the laboratory only recently. WNV has been identified in Spain in humans, birds and equids. Human cases corresponded to three hospitalized men, one in 2004 [18] and the others in September 2010 [19]. Bird cases, in which WNV RNA was detected, were found in two emblematic species of Spanish predatory birds

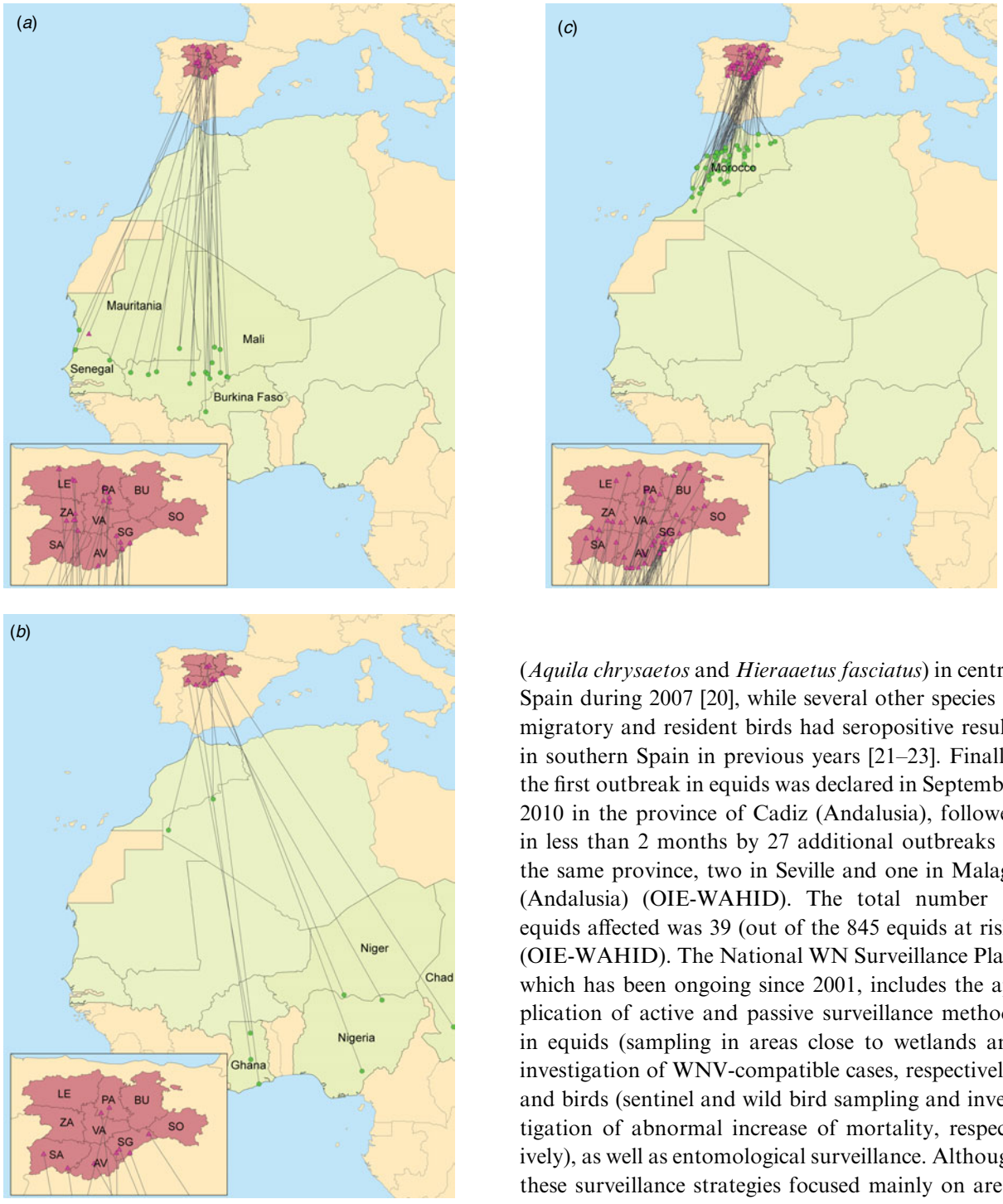


Fig. 1. Castile and Leon – Africa band records of wild birds. Triangles denote banding locations. All locations, except for one in Mauritania, are in the different provinces of Castile and Leon: Avila (AV), Burgos (BU), Leon (LE), Palencia (PA), Salamanca (SA), Segovia (SG), Soria (SO), Valladolid (VA) and Zamora (ZA). Dots denote band recovery locations, mainly in (*a*) African western countries, (*b*) African eastern countries and (*c*) Morocco. [Source: Spanish Office of Migratory Species (OEM, MARM) and Animal Health Research Centre (CISA-INIA).]

(*Aquila chrysaetos* and *Hieraaetus fasciatus*) in central Spain during 2007 [20], while several other species of migratory and resident birds had seropositive results in southern Spain in previous years [21–23]. Finally, the first outbreak in equids was declared in September 2010 in the province of Cadiz (Andalusia), followed in less than 2 months by 27 additional outbreaks in the same province, two in Seville and one in Malaga (Andalusia) (OIE-WAHID). The total number of equids affected was 39 (out of the 845 equids at risk) (OIE-WAHID). The National WN Surveillance Plan, which has been ongoing since 2001, includes the application of active and passive surveillance methods in equids (sampling in areas close to wetlands and investigation of WNV-compatible cases, respectively) and birds (sentinel and wild bird sampling and investigation of abnormal increase of mortality, respectively), as well as entomological surveillance. Although these surveillance strategies focused mainly on areas close to the most important wetlands of Spain, the cost-effectiveness of the surveillance programme could be optimized if new strategies were mainly allocated to suitable areas for WNV. Considering the marked consequences of WNV in equids and humans, a highly sensitive surveillance system is highly recommended.

Therefore, the goal of the study presented here was to identify suitable areas for WNV outbreak

occurrence by using a GIS-based framework at a high geographical resolution in one of the most important regions of Spain in terms of equid production, i.e. C&L. Methods and results presented here may guide risk-based surveillance systems for WNV in C&L or other Spanish or European regions with similar conditions and, ultimately, may help to prevent future outbreaks in equid and human populations.

METHODS

GIS-based WLC was performed in three analytical steps: (1) identification of risk factors related to WNV suitability, data gathering and generation of spatial maps for each risk factor, (2) generation of the WNV suitability map and (3) sensitivity analysis.

Identification and mapping of risk factors related to WNV suitability

A systematic review of the published literature was performed in electronic resource databases (PubMed, ISI Web of Knowledge) combining several terms such as 'West Nile' AND 'risk factors', 'West Nile' AND 'temperature', 'West Nile' AND 'climatic conditions', 'Culex' AND 'temperature' and so on, and all references found were stored in EndNote®. Hence, five risk factors for WNV suitability were identified and mapped in a raster format of 1 km² cell size: distance from aquatic areas, temperature, rainfall, presence of wild birds, and equid density.

To the best of the authors' knowledge, distribution maps of *Cx. pipiens* have not been published until now. However, many studies have described the climatic and environmental variables that could favour an increase in *Culex* spp. populations. The first factor to be considered is the distance from aquatic areas. Almost all WNV outbreaks in Europe have occurred near to water areas, especially in deltas with abundant populations of birds and mosquitoes that interact with human and equid populations [1]. In fact, we estimated that the 205 OIE-notified European and Mediterranean outbreaks that occurred from 1999 to 2010 were at a mean distance of 3·2 km (95% confidence interval 0·2–11·7 km) from the main aquatic areas. The presence of aquatic habitats seems to be the most influential factor for vector survival and activity mainly because the first three stages of *Culex* spp. development (egg incubation, larva development, pupa development) occur in such areas. Even when these mosquitoes become adults, their flying range is limited to an area of movement not further than 7 km from aquatic areas, preferentially at 2 km [11]. For our study, we measured the Euclidean distance to each hydrological feature in ArcGIS maps (rivers and their tributaries, lakes, reservoirs and wetlands; information obtained from ESRI 2005), assuming that the closest areas to the aquatic features have the highest suitability for *Culex* spp. and the value decreases linearly up to 7 km. Areas beyond 7 km were accordingly excluded.

Another important factor for *Culex* spp. suitability is temperature. Vector survival, breeding, feeding and development are affected by temperature [11, 24]. High temperatures (30–32 °C) promote faster mosquito maturation and a decrease in the virus incubation period in mosquitoes, although extremely high temperatures (above 35–40 °C) may prove fatal. Bearing in mind that *Culex* spp. mosquitoes live only 2 weeks, the faster the virus develops, the greater the likelihood of transmitting the virus to a susceptible [25–27]. Conversely, low temperatures (14–18 °C) cause a decrease in the mosquitoes' metabolic activity, flight and feeding behaviour [26, 28]. As a consequence, optimal temperature conditions for the presence of *Cx. pipiens* in C&L only occur during April–October. This period was established based on the knowledge that the minimal temperature that allows viral replication in vectors is estimated to be 14 °C [27].

Rainfall rate is another factor that has been positively associated with abundance of *Culex* spp., although the relationship is not so clear [11, 12, 16] as it may be influenced by local factors, such as topography, type of soil or vegetation. These parameters directly impact the soil capacity of creating stagnant water, which is the preferred habitat of mosquitoes.

Temperature and rainfall rates were obtained from the Agrarian GIS MARM database [29]. The data consisted of the monthly mean temperature and rainfall rates from April to October during the last 50 years, gathered from each of the 218 and 754 point locations where temperature and rainfall climate stations were situated in C&L, respectively. Raster maps for temperature and rainfall were obtained by using the inverse distance weighted algorithm for each month at risk.

Regarding the presence of wild birds in Spain, it is known that the arrival of breeding migratory birds from Africa, that may have spent the winter in infected areas, occurs primarily in spring, although depending on the species and latitude they may arrive

Table 1. *Breeding and resident wild bird species for WNV outbreak occurrence in Castile and Leon*

Scientific name	Common name	Order	Family
Anas platyrhynchos	Mallard	*Anseriformes*	Anatidae
Burhinus oedicnemus	Stone curlew	*Charadriiformes*	Burhinidae
Charadrius dubius	Little ringed plover	*Charadriiformes*	Charadriidae
Actitis hypoleucos	Common sandpiper	*Charadriiformes*	Scolopacidae
Ciconia ciconia	White stork	*Ciconiiformes*	Ciconiidae
Streptopelia turtur	Turtle dove	*Columbiformes*	Columbidae
Alcedo atthis	Common kingfisher	*Coraciiformes*	Alcedinidae
Merops apiaster	European bee-eater	*Coraciiformes*	Meropidae
Milvus migrans	Black kite	*Falconiformes*	Accipitridae
Fulica atra	Eurasian coot	*Gruiformes*	Rallidae
Gallinula chloropus	Common moorhen	*Gruiformes*	Rallidae
Pica pica	Common magpie	*Passeriformes*	Corvidae
Sturnus unicolor	Spotless starling	*Passeriformes*	Corvidae
Emberiza cirlus	Cirl bunting	*Passeriformes*	Emberizidae
Carduelis carduelis	Goldfinch	*Passeriformes*	Fringillidae
Serinus serinus	Serin	*Passeriformes*	Fringillidae
Hirundo rustica	Barn swallow	*Passeriformes*	Hirundinidae
Riparia riparia	Sand martin	*Passeriformes*	Hirundinidae
Anthus spinoletta	Water pipit	*Passeriformes*	Motacillidae
Motacilla alba	White wagtail	*Passeriformes*	Motacillidae
Motacilla cinerea	Grey wagtail	*Passeriformes*	Motacillidae
Motacilla flava	Yellow wagtail	*Passeriformes*	Motacillidae
Oriolus oriolus	Golden oriole	*Passeriformes*	Oriolidae
Passer montanus	Eurasian tree sparrow	*Passeriformes*	Passeridae
Remiz pendulinus	European penduline tit	*Passeriformes*	Remizidae
Acrocephalus arundinaceus	Great reed warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Acrocephalus scirpaceus	Reed warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Cettia cetti	Cetti's warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Cisticola juncidis	Streaked fantail warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Hippolais polyglotta	Melodious warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Sylvia borin	Garden warbler	*Passeriformes*	Sylvidae
Luscinia megarhynchos	Nightingale	*Passeriformes*	Turdidae
Luscinia svecica	Bluethroat	*Passeriformes*	Turdidae
Jynx torquilla	Eurasian wryneck	*Piciformes*	Picidae
Picus viridis	Green woodpecker	*Piciformes*	Picidae
Otus scops	European scops owl	*Strigiiformes*	Strigiidae

sooner or later. Such birds remain in Spain until the beginning of autumn, coinciding with the first arrivals of the wintering birds from northern Europe. This range of time, between spring and autumn, coincides with the time at which WNV outbreaks tend to occur in the Mediterranean basin (July–September), which is also favourable for the increase in mosquito populations [8]. The highest seroprevalences in these summer migratory birds and resident species has also been described by Figuerola *et al*. [22].

We used four criteria to select the bird species that most contribute to the suitability of WNV in C&L: (i) relation to WNV outbreaks, (ii) period of the year, (iii) habitat and (iv) abundance. The first criterion refers to whether or not the wild bird species were likely to come from countries with WNV outbreaks. Currently, WNV circulates in many European countries and the Mediterranean basin. However, the highest prevalences have been found in sub-Saharan countries, from which many species of birds fly to Spain to breed [22]. Given this criterion, breeding species were selected from the migratory birds from the bird information guide of C&L [30]. Second, we selected only those species that were present in large numbers during the maximum estimated period of vector abundance.

Given the clear link between WNV and aquatic environment, we selected only birds associated with an aquatic habitat (wetlands, rivers, riversides, riverside forests, reservoirs) from the bird information

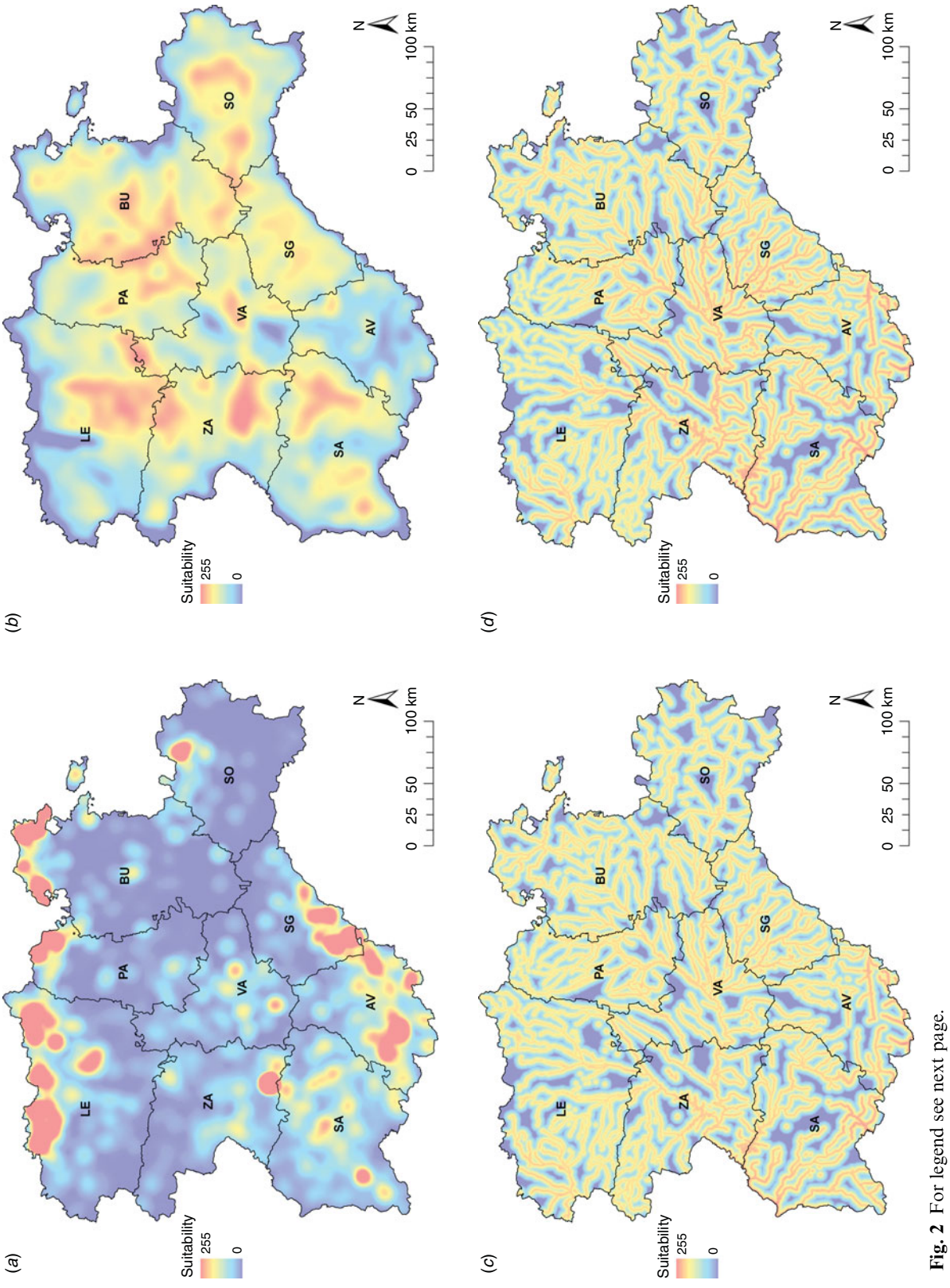


Fig. 2 For legend see next page.

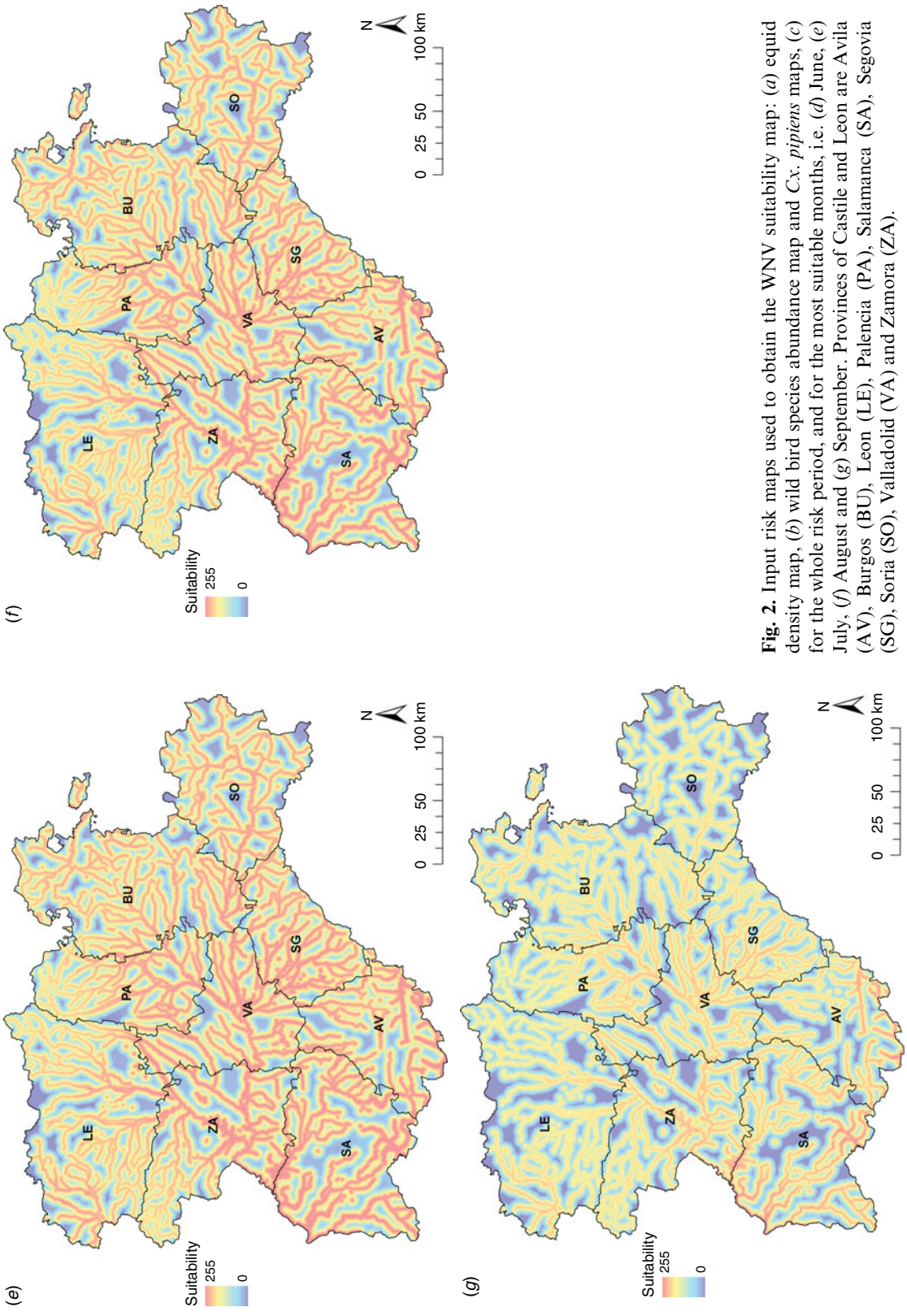


Fig. 2. Input risk maps used to obtain the WNV suitability map: (*a*) equid density map, (*b*) wild bird species abundance map and *Cx. pipiens* maps, (*c*) for the whole risk period, and for the most suitable months, i.e. (*d*) June, (*e*) July, (*f*) August and (*g*) September. Provinces of Castile and Leon are Avila (AV), Burgos (BU), Leon (LE), Palencia (PA), Salamanca (SA), Segovia (SG), Soria (SO), Valladolid (VA) and Zamora (ZA).

guide of C&L [30], and also considered breeding and resident species. The last criterion used was abundance. Given the apparent lack of specificity of WNV to certain bird species, and considering that high density of birds may contribute to the amplification and spread of WNV, we selected all bird species considered to be abundant (i.e. more than 2000 pairs) from the bird information guide of C&L [30]. This criterion included resident as well as breeding birds in C&L with wintering quarters in North and sub-Saharan African countries. According to these four criteria, from a total of 199 bird species, 32 were selected (Table 1) and their distribution areas obtained from the MARM database [31]. For each bird species, a raster map was generated with values 1 or 0 in each cell, designating presence or absence of the specific bird in its nesting zones, respectively. Then, the 32 maps were joined by summing their presence/absence value.

The last risk factor considered for WNV suitability was equid density [24, 32]. Equids and humans are highly susceptible to WN disease, but usually outbreaks in equids are notified earlier than outbreaks in humans, mainly because equids are more exposed to vector bites. Moreover, vectors may be attracted by areas with a high density of equids because of the high excreted volumes of CO_2. Location of the 9423 equid premises and census (i.e. number of equids on premises, ranging from 1 to 2050 animals) were provided by the Regional Government of C&L. We used a kernel density function to create a raster map of equid density in the C&L region of Spain.

WNV suitability map

Once the raster maps for each risk factor were created, we performed a standardization process to provide a unique comparable scale that allowed the combination of each risk factor before producing the suitability map. The method used for standardization is referred to as linear scaling [33] and uses the following formula:

$$x_i = \frac{R_i - R_{\min}}{R_{\max} - R_{\min}} \cdot \mathrm{SR},$$

where x_i denotes the index value of each risk factor x for each cell I; R_i is the raw score of the factor x for the cell i; $R_{\min}$ is the minimum score (except for temperature where the minimum degrees for virus replication in the vector were considered as 14 °C); $R_{\max}$ is the maximum score and SR is the standardized range, 255. The index value (x_i) will consequently range between 0 and 255. We used this byte scale, which has been recommended by Drobne & Lisec [33] because it optimizes the computation for geo-statistical analysis. Suitability maps are presented on a graduated blue/green/yellow/orange/red scale, ranging from 0 to 255. The final WNV suitability maps were rescaled to 0–1 to facilitate interpretation.

Weights for each risk factor were given based on available literature and expert opinion and combined by using the WLC. This method is based on the following equation:

$$R_i = \sum_{j=1}^{n} w_j \cdot x_{ij}$$

where R_i is the aggregation result for each cell i, w_j is the weight of the risk factor j and x_{ij} is the value of the cell i for the risk factor j, assuming that there are a total number of n risk factors.

Specifically for this framework, the WLC applied was:

$$R_{si} = 0{\cdot}45 \cdot R_{ei} + 0{\cdot}30 \cdot R_{\mathrm{wb}i} + 0{\cdot}25 \cdot R_{\mathrm{cp}i},$$

where R_{si} is the aggregation result for each cell i of the WNV suitability map; R_{ei} is the value for each cell i of the equid map; $R_{\mathrm{wb}i}$ is the value for each cell i of the wild bird map; $R_{\mathrm{cp}i}$ is the value for each cell i of the *Cx. pipiens* map. The latter was estimated as:

$$R_{\mathrm{cp}i} = 0{\cdot}48 \cdot R_{\mathrm{dh}i} + 0{\cdot}36 \cdot R_{ti} + 0{\cdot}16 \cdot R_{\mathrm{rr}i},$$

where $R_{\mathrm{dh}i}$ is the raster value of the distance from humid areas map; R_{ti} is the value of the temperature map and $R_{\mathrm{rr}i}$ is the raster value of the rainfall rate map.

The 'weighted sum' function of the ArcGIS 9.2 (ESRI, 2006) software was used to perform the analysis for each one of the 94 243 cells registered in C&L for each risk factor and to draw the final WNV suitability map. Areas from low (0) to high (255) WNV suitability in C&L were represented using colours from blue to red, respectively.

Sensitivity analysis

All modellers are aware that the weight applied to each factor to obtain the suitability map is the most critical (and subjective) aspect when using WLC. For this reason, we performed an extensive sensitivity analysis to evaluate the influence that changes on the relative weights of the input factors could have on model outcomes. The analysis was performed by systematically increasing and decreasing the weights

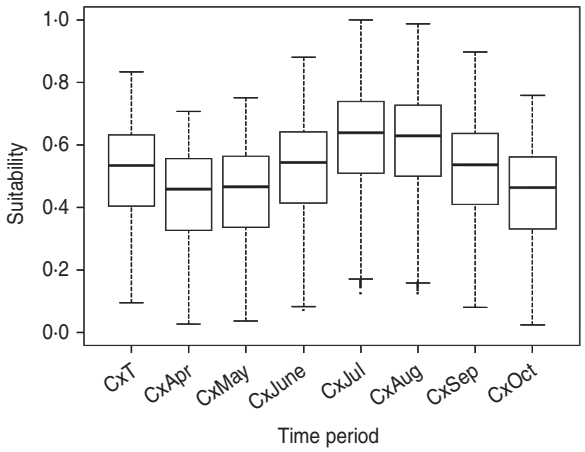


Fig. 3. Suitability for *Cx. pipiens* for each raster cell during the whole risk period (i.e. CxT) and for each of the seven months [from April (CxApr) to October (CxOct)].

for each of the input maps by a total of 25% of their initial value. In this way, a total of 10 different scenarios were tested. We used non-parametric Spearman correlation coefficients and box-plots to compare the outputs obtained in the reference scenario (see first three subsections of the Methods section) with the outputs obtained in each of the 10 new experiments. A change of $<10\%$ in the suitability map scores and on correlation coefficients, as well as overlapping of the notches of the box-plot was considered evidence of the robustness of the model to variations in weights. R-language (v. 2.11.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2010) was used to perform the analysis.

RESULTS

Risk factor suitability maps

Equid density, wild bird presence and occurrence of environmental variables favourable for the establishment of mosquito populations were not homogeneously distributed in the Spanish region of C&L (Fig. 2).

Equid density was mainly concentrated in the northern strip of Leon (LE), Palencia (PA) and Burgos (BU), and the southern area of Segovia (SG) and Avila (AV) in the Central System region. Other equid-dense areas can be found in Soria (SO), Zamora (ZA) or Valladolid (VA). Similarly, the wild bird abundance map represented the biodiversity of migratory and resident breeding birds. In the eastern half of the region, the map showed a more uniform wild bird distribution, highlighting some areas (especially in PA-BU and SO). In the western provinces, such as LE, ZA and Salamanca (SA), important suitable areas were identified, whereas the rest of the region was less suitable.

The suitability of *Cx. pipiens*, which was obtained by combining the distance from the aquatic areas map with the temperature and rainfall maps, was higher in the southwest part of the region (Fig. 2), with July and August the months with the greatest potential to host *Cx. pipiens* populations (Fig. 3).

WNV suitability map

Zones with the highest suitability for WNV outbreaks were concentrated in the Guadarrama mountains (south of SG and a small part of AV) and the Cantabric mountains (north of LE, PA and BU) (Fig. 4). Some other suitable areas were located in SA, south of ZA, north of SO and the centre of VA, the majority coinciding with important riverbeds (Fig. 4).

Summer months were the most suitable for a WNV outbreak occurrence, mainly due to the highest presence of *Cx. pipiens*, specifically July and August (Fig. 5). The main suitable spots remained for the whole period, but during July and August suitability scores increased in these areas and their surroundings.

Sensitivity analysis

There was $<10\%$ change when comparing the overall scores of the WNV suitability maps obtained for the reference scenario with those obtained for each of the 10 alternative scenarios. Furthermore, we did not find differences in the distribution and values (box-plots overlapping and Spearman rank correlation not lower than 0·988) when comparing each cell of the suitability map obtained for the reference scenario with those obtained for the 10 alternative scenarios (Fig. 6). Consequently, model results were considered to be robust and not sensitive to changes in the relative weights of the input risk factors.

DISCUSSION

This paper presents the first WNV suitability map in a European context. The application of a GIS-based WLC framework together with information on risk factors for WNV outbreak occurrence such as equid density, wild birds and *Cx. pipiens* potential habitat, allowed us to estimate the main areas for WNV suitability in the largest and one of most important regions for equid production in Spain.

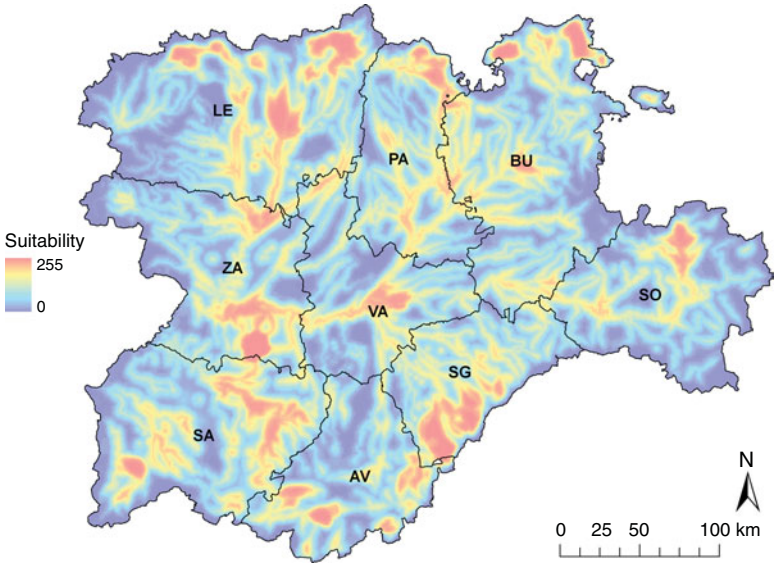


Fig. 4. WNV outbreak occurrence suitability map in the Castile and Leon region of Spain considering the whole risk period, from April to October. Provinces of Castile and Leon are Avila (AV), Burgos (BU), Leon (LE), Palencia (PA), Salamanca (SA), Segovia (SG), Soria (SO), Valladolid (VA) and Zamora (ZA).

The regions where WNV outbreaks were more likely to occur were mainly located in the northern and southern parts of C&L, which have high density of both equids and wild birds. Most of these locations, which were mainly distributed along the mountain chains that surround the region, are designated as Important Bird Areas (IBAs). The IBAs are recognized areas where bird biodiversity is specially protected and that concentrate exceptionally large numbers of migratory or congregatory species. Many of these relevant IBAs are very close (or include) important hydrological features, such as the Tietar valley, in AV, and the reservoirs of Riaño, in LE, or Aguilar de Campoo, in PA. The great biodiversity found in the IBAs together with the presence of competent vectors could favour the circulation of WNV in these areas, as hypothesized in other regions with similar conditions [34]. Moreover, WNV suitability was found to increase in the summer months. This is in agreement with the seasonal variation described for *Cx. pipiens* [22, 35, 36] as well as with the increase of WNV outbreaks historically registered in the Mediterranean basin [8, 37, 38]. If we consider that outdoor equid activities are popular and frequent in the surroundings of IBAs, and occur mainly in summer time, the potential exposure of equids to mosquito bites is likely to occur.

Historically, the combination of spatial factors by WLC has been used to estimate disease suitability in the absence of more detailed epidemiological datasets both in developed or developing countries [13]. It also serves as a good approximation to identify high-risk areas where more specific studies can be conducted in the future. However, it should be noted that general environmental and climatic factors are not always good indicators of vector distribution, as there are micro-climatic conditions that may determine an increase of the presence/abundance of vector populations and that are difficult to incorporate into the model. It is clear that there is an evident need to quantify the abundance and distribution of the competent vectors, not only for the evaluation of WNV but also for other vector-borne diseases. In Spain, for example, the entomological surveillance of bluetongue has yielded very useful information to better prevent and control the disease [e.g. 39]. It would be very useful for WNV surveillance to improve the *Cx. pipiens* abundance map presented here for the whole Spanish territory. Following the results presented in this study, the trapping and estimation of *Cx. pipiens* abundance could be prioritized in the areas and time periods identified as highly suitable for WNV outbreaks, and, if financial and personal resources are available, other regions or time periods of Spain could also be studied.

One of the important limitations of the GIS-based WLC method is the potential subjectivity associated with the selection and weighting of risk factors, which could certainly bias the results obtained. In this paper, we performed an intensive review of published

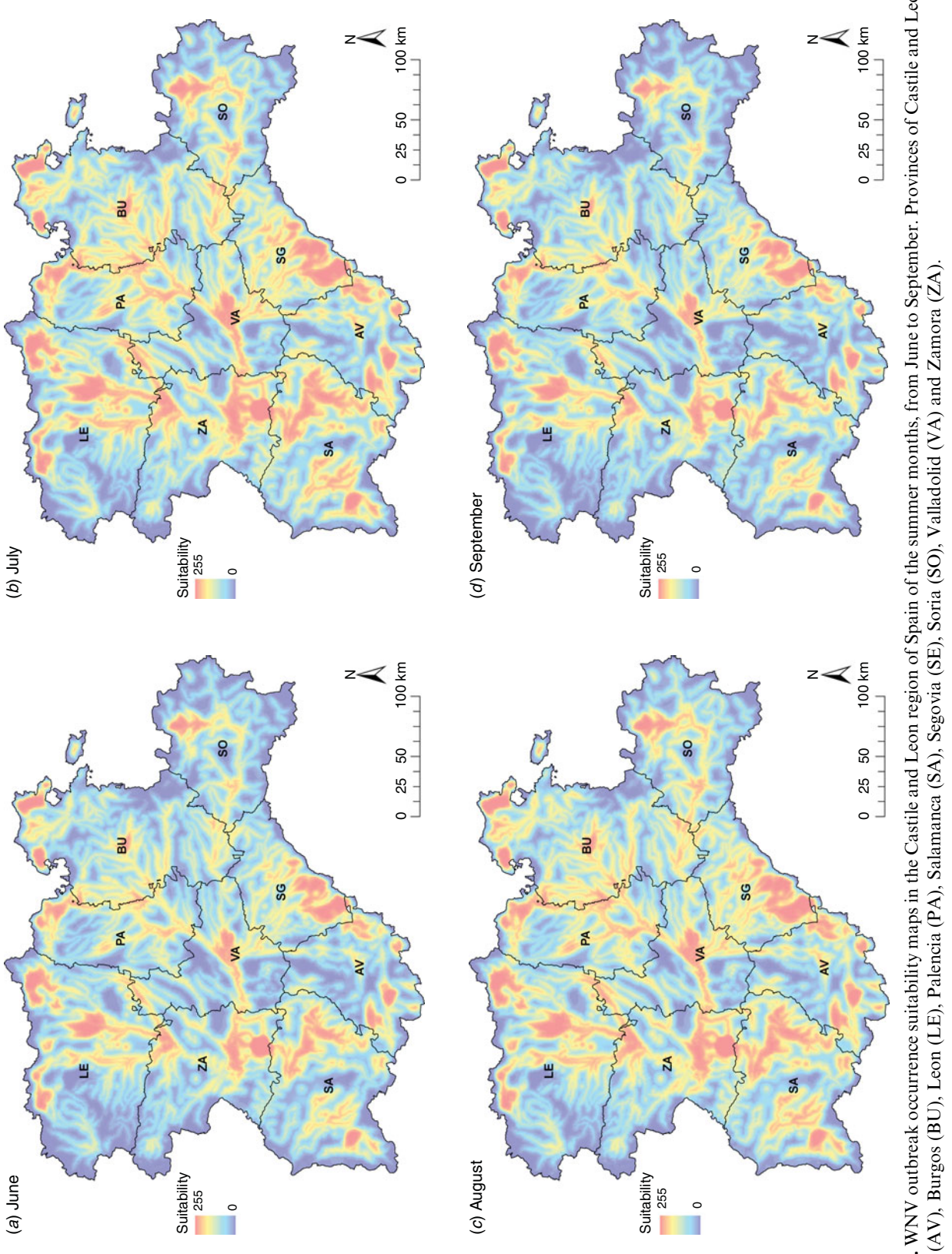


Fig. 5. WNV outbreak occurrence suitability maps in the Castile and Leon region of Spain of the summer months, from June to September. Provinces of Castile and Leon are Avila (AV), Burgos (BU), Leon (LE), Palencia (PA), Salamanca (SA), Segovia (SE), Soria (SO), Valladolid (VA) and Zamora (ZA).

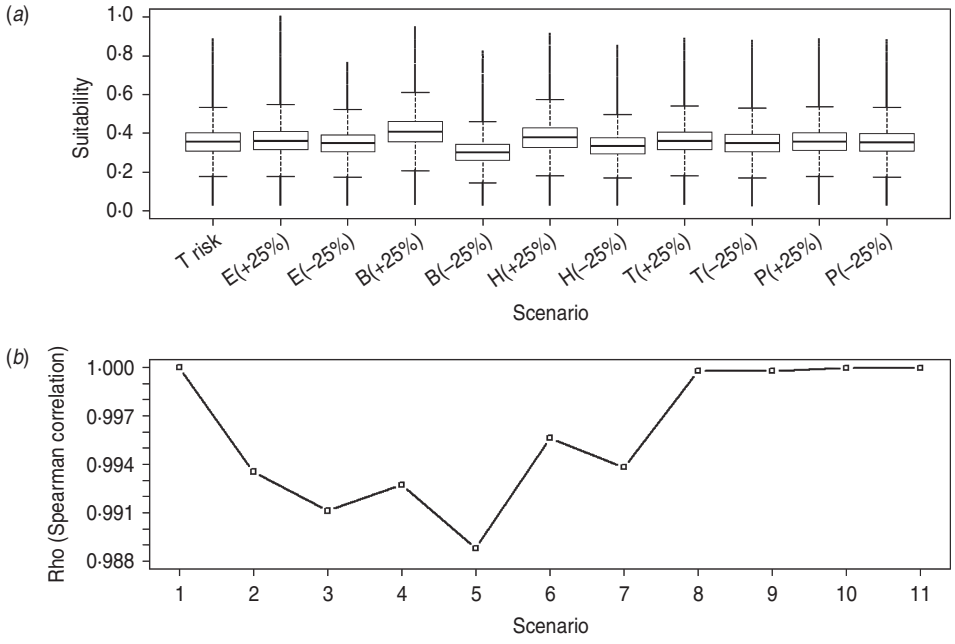


Fig. 6. Distribution of WNV outbreak occurrence suitability scores for raster cells of the reference scenario (i.e. T risk) and each of the scenarios with changes on the relative weights of the input risk factors (i.e. alternative scenarios) (*a*) and Spearman correlation coefficients (Rho) between raster cells of reference scenario and of every alternative scenario (*b*). E, Equid density; B, wild bird density; H, distance to humid areas; T, temperature; P, rainfall; (+25) and (–25) represent the increase and decrease on the relative weights for each scenario, respectively. Scenarios 1–11 in panel (*b*) correspond to combination between the reference scenario (T risk) and every alternative scenario represented in panel (*a*) [1, T risk *vs*. T risk; 2, T risk *vs*. E(+25); 3, T risk *vs*. E(–25), etc.].

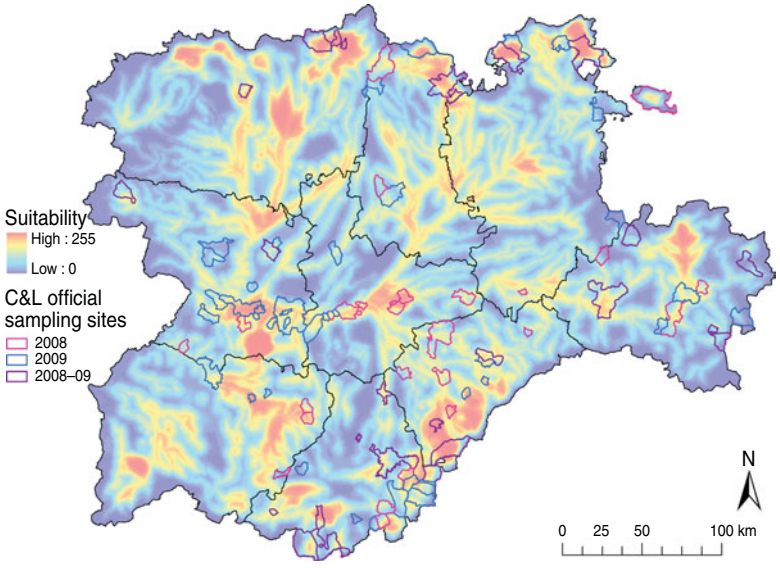


Fig. 7. Overlay of the distribution of the main sampling areas for wild birds and equids of the 2008 and 2009 WN Surveillance Plan for Castile and Leon and the WNV outbreak occurrence suitability map of Castile and Leon. Sample municipalities were obtained from the Regional Government of Castile and Leon region.

scientific literature and an expert opinion elicitation in order to better select and weight the risk factors. Due to the potential bias associated with the weighting scores, sensitivity analysis is a necessary procedure to assess how changes in weights can impact model outcomes. The results of the sensitivity analysis showed

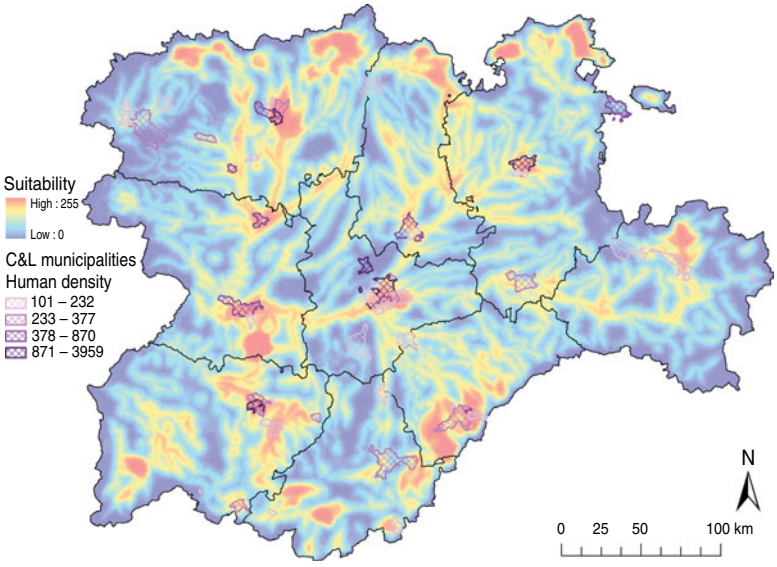


Fig. 8. Overlay of the high human density areas (> 100 habitants/km²) and the WNV outbreak occurrence suitability map of Castile and Leon.

that model results were not sensitive to changes in weighting scores, which supports the robustness of the model outcomes (Fig. 5).

Since the real and complete epidemiological cycle of the virus is not completely understood, the model may be overlooking some relevant aspects of the reality of the disease. Some improvements of the model, mainly related to spatio-temporal variations of the risk factors, may be incorporated in the future if information becomes available. As an example, the distance from aquatic areas map represents the limitation of a static measure, which means that aquatic areas are assumed not to change during the period at risk, remaining full even in the driest months. Similarly, the wild bird map represents the distribution (i.e. nesting areas) of the selected bird species in certain locations. However, birds can move easily and this spatial variation is difficult to incorporate into a map. This problem was partially solved by using nesting zones instead of bird observations, which consider that bird populations in that moment are more sedentary, therefore this was recognized as the best available estimator. Moreover, although resident and breeding bird species warrant the main interest, other species could be considered, particularly wintering species. Wintering birds, which are mainly aquatic birds, arrive in Spain as early as August, and thus, can easily have contact with mosquitoes. These birds could move through short migrations from Mediterranean regions to C&L even in a single day, reaching the most suitable areas when temperature is favourable for a WNV outbreak occurrence. Furthermore, it is known that many migratory birds move from European countries to C&L, and vice versa. In particular, there are bird movements registered between Spain and certain European areas such as northern Italy, where the virus periodically recirculates (OIE-WAHID). Subsequently, these species should be added to future work. Nevertheless, considering that C&L is included in the Atlantic migratory routes, which originate in northern European countries where WNV has not currently been detected, that temperatures in C&L can be very low at the end of summer, and that no information was readily available to accurately map the presence of those birds, wintering birds were not considered in this analysis.

One of the main advantages of the methods and results presented here is that they can be directly used to optimize the allocation of sanitary resources of future risk-based surveillance and control programmes for WNV in the C&L region. For example, there are some suggested improvements for application in the current WN surveillance programme in C&L, which are mainly based on the active sampling of equids, taking place during August and September. First, the allocation of equids to be sampled, which is currently selected based only on the abundance of wild birds, should also consider the species of wild birds at high risk for WNV suitability and the potential presence of *Culex* spp., which is reflected in the

WNV suitability map presented in this study (Figs 4 and 5). In fact, according to our model, only 38 (45·78%) of the current sampling locations in the C&L surveillance programme were estimated to be suitable for WNV outbreaks (Fig. 7). Furthermore, July, a month not currently included in the surveillance plan, concentrates the highest suitability, which reflects that sampling strategies should begin earlier, not in August as currently programmed. All these strategies are aimed at the early detection WNV which, ultimately, will help to rapidly control the infection and to prevent further spread of WNV into the region.

The identification of suitable areas for WNV would also help to prevent WNV epidemics in human populations. Only 61/2248 municipalities in the C&L region have a population density >100 habitants/km² (INE database), but 40 (65·57%) of those densely populated municipalities are in areas identified as highly suitable for WNV outbreaks (Fig. 8). These municipalities should be targeted in public health surveillance and training programmes to rapidly detect any WNV incursion which can affect human populations.

Although many uncertainties exist, several mechanisms such as enzootic transmission throughout the year in temperate regions, the vertical transmission described in some vectors or the overwintering of infected mosquitoes, may contribute to the endemicity of WNV into a country or, at least, the maintenance of the infection during the inter-epizootic periods [5, 8]. These critical aspects, together with the re-emergence and increasing severity of WNV cases into the Mediterranean area in recent years, pose a considerable threat to Spain. The identification of suitable areas for WNV outbreaks presented in this study may facilitate the implementation of risk-based surveillance systems to better prevent and control disease in equid and human populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The project was funded by an FPU grant of the Ministry of Education and a collaboration agreement, TRAGSA (367/2008), between the Regional Government of Castile and Leon (JCyL) and the Complutense University of Madrid. We gratefully acknowledge the assistance of Olga Mínguez and her team (JCyL), as well as Irene Iglesias and Jaime Bosch (CISA-INIA), for providing data and assistance in the interpretation of the results.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Hubálek Z, Halouzka J.** West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 1999; **5**: 643–650.
2. **Higgs S, Snow K, Gould EA.** The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; **98**: 82–87.
3. **Sebastián MM, *et al.*** Pathological, entomological, avian and meteorological investigation of a West Nile virus epidemic in a horse farm. *Transboundary and Emerging Diseases* 2008; **55**: 134–139.
4. **Kramer LD, Styer LM, Ebel GD.** A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annual Review of Entomology* 2008; **53**: 61–81.
5. **Komar N.** West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Advances in Virus Research* 2003; **61**: 185–234.
6. **Cabre O, *et al.*** West Nile virus in horses, sub-Saharan Africa. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **12**: 1958–1960.
7. **Sotelo E, *et al.*** Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* 2009; **395**: 289–297.
8. **Calistri P, *et al.*** Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *Open Virology Journal* 2010; **4**: 29–37.
9. **Mostashari F, *et al.*** Dead bird clusters as an early warning system for West Nile virus activity. *Emerging Infectious Diseases* 2003; **9**: 641–646.
10. **Ward MP, Scheurmann JA.** The relationship between equine and human West Nile virus disease occurrence. *Veterinary Microbiology* 2008; **129**: 378–383.
11. **Tachiiri K, *et al.*** Predicting outbreaks: a spatial risk assessment of West Nile virus in British Columbia. *International Journal of health Geographics* 2007; **5**: 21.
12. **Wimberly MC, *et al.*** Ecological niche of the 2003 West Nile virus epidemic in the Northern Great Plains of the United States. *PLoS ONE* 2008; **3**: e3744.
13. **Clements ACA, Pfeiffer DU.** Emerging viral zoonoses: frameworks for spatial and spatiotemporal risk assessments and resource planning. *Veterinary Journal* 2009; **182**: 21–30.
14. **Makropoulos CK, Butler D.** Spatial ordered weighted averaging: incorporating spatially variable attitude towards risk in spatial multi-criteria decision-making. *Environmental Modelling & Software* 2006; **21**: 69–84.
15. **Clements ACA, Pfeiffer DU, Martin V.** Application of knowledge-driven spatial modelling approaches and uncertainty management to a study of Rift Valley fever in Africa. *International Journal of Health Geographics* 2006; **5**: 57.

16. **Chevalier V, *et al.*** Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiology and Infection* 2010; **138**: 1601–1609.
17. **Filipe AR, De Andrade HR.** Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virologica* 1990; **34**: 582–591.
18. **Kaptoul D, *et al.*** West Nile virus in Spain: reports of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2007; **39**: 70–71.
19. **Anon.** ProMED mail: Ministry of Health confirms a new case of West Nile virus in Benalup (Cadiz) [in Spanish] (http://www.adn.es/lavida/20101006/NWS-1446-Occidental-Benalup-Salud-Nilo-confirma.html). Archive number: 20101006.3626, 6 October 2010.
20. **Jiménez-Clavero MA, *et al.*** West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 2008; **14**: 1489–1491.
21. **Figuerola J, *et al.*** Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathology* 2007; **36**: 209–212.
22. **Figuerola J, *et al.*** Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Veterinary Microbiology* 2008; **132**: 39–46.
23. **López G, *et al.*** Prevalence of West Nile virus antibodies in Spain is related to the behaviour of migratory birds. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008; **8**: 615–621.
24. **Ward MP.** Epidemic West Nile virus encephalomyelitis: a temperature-dependent, spatial model of disease dynamics. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; **71**: 253–264.
25. **Epstein PR.** West Nile virus and the climate. *Journal of Urban Health* 2001; **78**: 367–371.
26. **López-Vélez R, Molina Moreno R.** Climate change in Spain and the risk of infectious and parasitic diseases transmitted by arthropods and rodents [in Spanish]. *Revista Española de Salud Pública* 2005; **79**: 177–190.
27. **Reisen WK, Fang Y, Martinez VM.** Effects of temperature on the transmission of West Nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 2006: **43**: 309–317.
28. **Mellor PS, Leake CJ.** Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 2000; **19**: 41–54.
29. **Agrarian Geographic Information System (SIGA-MARM) database** (http://www.mapa.es/es/sig/pags/siga/intro.htm). Accessed 30 June 2010.
30. **Sanz-Zuasti J, Velasco T.** *Vertebrate Fauna of Castile and Leon, Volume I: Birds* [in Spanish]. Medina del Campo (Valladolid, Spain): Náyade, 2005.
31. **Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs (MARM).** National Biodiversity Inventory database (http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/inventarios/inb/inventario_vertebrados/index.htm). Accessed 2 November 2010.
32. **Murgue B, *et al.*** West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerging Infectious Diseases* 2001; **7**: 692–696.
33. **Drobne S, Lisec A.** Multi-attibute decision analysis in GIS: weighted linear combination and ordered weighted averaging. *Informatica* 2009; **33**: 459–474.
34. **Durand B, *et al.*** Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Veterinary Record* 2005; **157**: 711–713.
35. **Malkinson M, *et al.*** Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 392–397.
36. **Ponçon N, *et al.*** Population dynamics of pest mosquitoes and potential malaria and West Nile virus vectors in relation to climatic factors and human activities in the Camargue, France. *Medical and Veterinary Entomology* 2007; **21**: 350–357.
37. **Zeller HG, Schuffenecker I.** West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology* 2004; **23**: 147–156.
38. **Sánchez-Seco MP, Navarro JM.** Infections with Tuscany virus, West Nile virus and other arboviruses of interest in Europe [in Spanish]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2005; **23**: 560–568.
39. **Calvete C, *et al.*** Ecological correlates of bluetongue virus in Spain: predicted spatial occurrence and its relationship with the observed abundance of the potential *Culicoides* spp. vector. *Veterinary Journal* 2009; **182**: 235–243.

Objetivo 3

Analizar la duración de la inmunidad tanto de ovejas tras la infección natural con el VSB como de su descendencia y valorar la eficacia de la respuesta inmune frente a desafíos experimentales.

Composición propia. Fuente de las imágenes originales:

1. Virus de Schmallenberg: Frierich-Loeffer Institut (FLI)
2. Ternero con malformación: FLI (Dr. M. Peters)
3. Cordero con malformación: Analítica Veterinaria
4. *Culicoides* sp.: T. Schmidtmann, USDA/ARS, 2012 [dominio público]
5. Mapa de brotes de la enfermedad de Schmallenberg: elaboración propia con datos de WAHID-OIE

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

La **enfermedad de Schmallenberg** (ESB) se detectó por primera vez a finales de 2011. Desde su descripción, la enfermedad se ha difundido rápidamente por Europa, afectando fundamentalmente a explotaciones ovinas y bovinas. A su vez, se han detectado anticuerpos en 12 especies silvestres y 19 de zoológico. Curiosamente, la infección por el virus de Schmallenberg (VSB) pasa prácticamente desapercibida en animales adultos, ocasionando en algunos casos un cuadro inespecífico leve. Sin embargo, su impacto radica en la afectación de hembras gestantes, en las cuales se puede producir una infección vertical que ocasiona fallo reproductivo con abortos y la producción de malformaciones congénitas. Una de las mayores incógnitas que planteó esta inesperada infección fue el tipo de inmunidad que los individuos infectados naturalmente adquirían, y si esta podría ser efectiva para frenar potenciales reinfecciones. Por ello, en este estudio se monitorizó la inmunidad de animales del único rebaño español declarado como infectado a la OIE. En primer lugar se muestrearon 24 hembras de este rebaño, todas seropositivas, para seleccionar a continuación nueve gestantes para realizar una inoculación experimental con el VSB. De estas, seis se sacrificaron antes del parto, y sus fetos se inspeccionaron en busca de lesiones compatibles con la infección. Asimismo, las tres restantes se mantuvieron hasta el momento del parto. A continuación, se planteó otra inoculación a los corderos tras un periodo de lactancia. De todos los individuos se fueron tomando muestras periódicamente a lo largo del estudio, para realizar análisis virológicos y serológicos. Las tres hembras mantenidas para el parto fueron seropositivas, pero mostraron una respuesta inmune bastante distinta entre ellas, similar a la de sus corderos. En cambio, no se pudo detectar el virus en ninguna de las muestras analizadas (*i.e.* fetos, corderos y ovejas). Todos estos hallazgos apuntan a que la inmunidad adquirida tras la infección natural podría ser suficiente para frenar futuras reinfecciones, lo que supone una clara ventaja de cara al control de la infección por el VSB en Europa.

Publicación principal de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Mouriño, M., Paradell, H., Plaja, L., Urniza, A. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014). **Natural immunity of sheep and lambs against the Schmallenberg virus infection**. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi 10.1111/tbed.12256.

Aportaciones científicas relacionadas

➢ *Publicaciones científicas de divulgación*

- Rodríguez-Prieto, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Apuntes sobre la enfermedad de Schmallenberg**. *Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA)*. Disponible *online* en: http://www.colvema.org/WV_descargas/VSBwebdef-09022012183038.pdf (último acceso: 10 de julio de 2014).
- Rodríguez-Prieto, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **El virus de Schmallenberg**. *Profesión Veterinaria* 77, 22-34.
- Rodríguez-Prieto, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **La enfermedad de Schmallenberg**. *Tierras Ganadería* 188, 24-30.
- Rodríguez-Prieto, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **La enfermedad de Schmallenberg y el ganado caprino**. *Tierras Ganadería*.

➢ *Ponencias*

- Rodríguez, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Enfermedades emergentes en el ganado ovino: lengua azul y enfermedad de Schmallenberg**. Ponencia en el *I Jornada Pfizer del Ganado Ovino en Cáceres*, El Complejo Álvarez, Cáceres.
- Rodríguez, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Enfermedades emergentes en el ganado ovino: lengua azul y enfermedad de Schmallenberg**. Ponencia en el X*IV Foro Nacional Ovino*, Reciento Ferial de Aranda de Duero, Burgos.

ORIGINAL ARTICLE

Natural Immunity of Sheep and Lambs Against the Schmallenberg Virus Infection

V. Rodríguez-Prieto[1], D. Kukielka[1], M. Mouriño[2], H. Paradell[2], L. Plaja[2], A. Urniza[2] and J. Manuel Sánchez-Vizcaíno[1]

[1] VISAVET Health Surveillance Centre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain
[2] Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L., Olot Girona, Spain

Keywords:
Schmallenberg virus; Orthobunyavirus; RT-PCR; ELISA; virus neutralization test; natural immunity; experimental challenge

Correspondence:
V. Rodríguez-Prieto. VISAVET Health Surveillance Centre, Complutense University of Madrid, Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 37 02; Fax: +34 91 394 39 08; E-mail: victor@sanidadanimal.info

Received for publication January 23, 2014

doi:10.1111/tbed.12256

Summary

Since the first reports of the Schmallenberg disease (SBD) outbreaks in late 2011, the disease has spread across Europe, affecting cattle and sheep farms. While Schmallenberg virus (SBV) causes a mild clinical disease in adults, infection of pregnant females may lead to the production of typical congenital malformations (CMFs) in their offspring. It is speculated that the immunity acquired after a SBV infection is effective in preventing further infections. However, this has not been proven in naturally infected sheep, especially if they are pregnant when reinfected. The aim of this study was to monitor the natural immunity in SBV-infected sheep. Twenty-four ewes from the only Spanish farm with a SBV OIE-notified outbreak were sampled. Subsequently, nine pregnant ewes were inoculated with SBV infectious plasma under controlled conditions. Six of them were euthanized before delivery, and their fetuses were inspected for lesions indicative for the SBV infection. The three remaining ewes were allowed to deliver one lamb each. Inoculation of the lambs was scheduled at approx. 3 months after birth. All samples were analyzed for viral RNA by RT-PCR, and for antibodies by an indirect ELISA and a virus neutralization test (VNT). The majority of the 24 ewes showed a serological reaction against SBV. The three ewes that were allowed to lamb down demonstrated variable degrees of seroconversion which corresponded to the levels of immune reaction observed in their lambs. Moreover, no viral RNA was detected, no lesions were observed in the fetuses, and no clinical signs were detected in the inoculated animals. These findings suggest that the immunity acquired by sheep following a natural SBV infection could be sufficient to stop SBV reinfection. However, vaccination could be a valuable tool to control SBV infections and associated economic losses as it affords a more uniform and predictable protection at the flock/herd level.

Introduction

During late summer 2011, the occurrence of outbreaks of a nonspecific, short-lasting syndrome in cattle farms was reported in several European countries (Hoffmann et al., 2012). The most commonly described symptoms were fever, drop in milk production and/or diarrhea, while the diagnosis for the most common pathogens was not conclusive. Soon afterwards, the use of metagenomics allowed for identification of the causative agent as a new RNA virus, which was subsequently named Schmallenberg virus (SBV; Hoffmann et al., 2012). The SBV belongs to the Simbu serogroup of the genus *Orthobunyavirus*. This group of arboviruses, transmitted by *Culicoides* spp. midges and mosquitoes, is represented by 25 arboviruses, such as Akabane (AKAV), Aino, Sathuperi and Shamonda (SHAV; Yanase et al., 2012). The SBV appears to have been recently introduced into Europe from tropical or subtropical regions (Gerhauser et al., 2013). However, although the SBV was primarily thought to be a new reassortant from these

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

viruses, it was proved to be phylogenetically more ancient, and even considered to be the ancestor of SHAV (Goller et al., 2012). The SBV is an enveloped virus with a segmented negative-sense RNA genome that encodes several proteins: a nucleoprotein (NP) and a nonstructural protein (NSs) by the S segment, two surface glycoproteins (Gc and Gn) and NSm by the M segment, and an RNA-dependent RNA polymerase by the L segment (Elliott and Blakqori, 2011). While the NP is the most abundant protein with an important function in the viral transcription and replication, the Gc acts as the major antigen, inducing a specific neutralizing antibody response (Bréard et al., 2013).

One of the peculiarities of the SBV is its rapid spread across Europe since the description of the first cases (EFSA, 2013; Afonso et al., 2014). Cattle were primarily affected, with more than 5600 outbreaks (64.56%), followed by sheep (33.57%), with only sporadic cases reported in goats (EFSA, 2013). While SBV causes a mild clinical disease in adults (even inapparent), infection of pregnant animals can lead to the production of typical congenital malformations (CMFs) in their fetuses, mainly in the musculoskeletal and the nervous systems due to the virus tropism for neurons both in the brain and the spinal cord (Varela et al., 2013). The most frequent CMFs are arthrogryposis and hydranencephaly, though others such as torticollis, scoliosis, brachygnathia, cerebellar hypoplasia or thymus hyperplasia were also described (OIE, 2013). The asymptomatic clinical phase between the infection of sheep (typically during the first third-half of pregnancy) and birth of congenitally deformed lambs delays the SBV detection making the control of the infection especially difficult.

In the context of AKAV infections, which have been studied for longer, the immunity acquired after natural infection appears to be long-lasting and effective enough to prevent reinfection (e.g. Taylor and Mellor, 1994). Regarding SBV, further studies are needed to draw definite conclusions. So far, Wernike et al. (2013a) reported that cattle experimentally reinfected with SBV did not develop viraemia, and the infection by the oral route or by contact with infected individuals proved to be ineffective. Though the time between the primary infection and the reinfection was short, the authors suggested that the immune protection elicited by natural infection could last for at least 2 months. It therefore seems that a post-infection immunity could limit the viral transmission from the infected vector to animals and thus could be considered as a natural way for controlling the infection, especially in areas where virus has been found to be circulating. However, animals that have not been in contact with the virus or new lambs could be susceptible to infection, developing a viraemia that could last more than 2 weeks and thus become a source of infection for the vector and their herd/flock mates (Claine et al., 2013). Furthermore, it is unknown whether naturally infected adult animals would be protected from future infection with SBV for a longer period of time. No knowledge exists either about the possible effects of such secondary SBV infections in pregnant animals. Therefore, the aim of this study was to analyze the natural immune response of sheep affected in the only OIE-reported outbreak of Schmallenberg disease (SBD) declared in Spain.

Materials and Methods

Schmallenberg virus outbreak in Spain

The Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (MAGRAMA) officially declared the first case of SBV infection in Spain on March 13th, 2012. This first outbreak occurred in Córdoba (Andalusia), in the municipality of Hinojosa del Duque. On March 5th, 2012 one ovine fetus was born with congenital lesions indicative of SBV infection, presenting arthrogryposis, kyphosis, lordosis and cerebellar hypoplasia. At the time when the SBV infection was confirmed, the farm maintained 644 sheep and 12 goats (MAGRAMA, personal communication).

After the declaration of the outbreak, the appropriate control actions were undertaken by the sanitary authorities. Those actions consisted of epidemiological investigations, official inspection in the affected holding, and control measures against the vector (RASVE, 2013). In order to study the SBV infection in depth, the animals of this herd were bought by the Health Surveillance Centre (VISAVET) of the Complutense University of Madrid (UCM).

Animals

Twenty-four ewes of the Merina breed originating from the SBV-affected flock were selected for the study. Blood samples were taken from the selected animals and sent to the National Central Veterinary Laboratory of Algete (LCV) to be tested for the SBV by the virus neutralization test (VNT). Subsequently, serum samples were collected on a monthly basis and sent to VISAVET to be analyzed by an indirect ELISA.

Eighteen days after the first sampling, several rams were introduced to the ewes. Mating was observed in all the females, and pregnancy was confirmed by ultrasonography 2 months later. After the positive pregnancy diagnosis, nine pregnant ewes were selected and moved to the biosafety level 3 (BSL-3) facilities of Zoetis (formerly Pfizer Animal Health) (Olot, Girona, Spain).

Experimental design

The pregnant sheep were housed in the BSL-3 laboratory of Zoetis over the whole study. An experimental timeline is shown in Fig. 1 and described below.

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

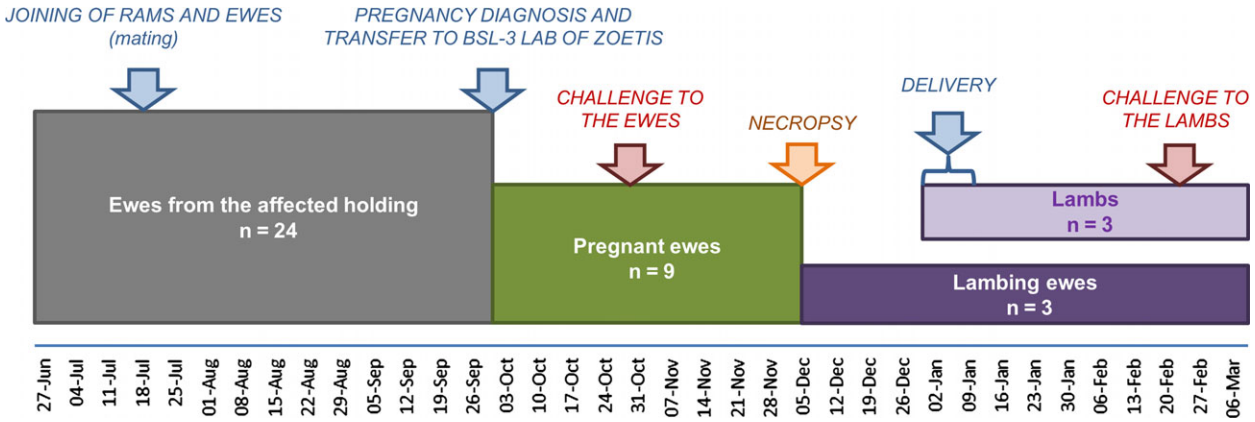


Fig. 1. Graph showing the timeline of the experiments and tests carried out.

SBV challenge in adults

The challenge with SBV took place at approx. 107 days after mating. The decision for inoculating at this late time of the pregnancy was made due to technical reason. The inoculation was performed using plasma obtained from a lamb 4 days after its intraveous (IV) inoculation with 1 ml of bovine-passaged SBV donated by the Friedrich-Loeffer Institute (FLI). Thus the inoculation dose was 20 ml of plasma containing $10^{5.28}$ SBV RNA copies/ml administered intravenously (IV, jugular vein).

Sampling for serological evaluation

Evaluation of the serological response was carried out with sera collection from all challenged animals starting on day 0 prior to the inoculation, and continued on days 2, 3, 4, 5 and 21 post-inoculation (pi), and subsequently tested for the presence of the specific anti-SBV antibodies and viral genome. The challenged animals were daily observed for clinical signs indicative of SBD, such as nasal discharge, loss of appetite, loss of body condition, or diarrhea.

Necropsy of six out of the nine pregnant ewes was performed on day 34 pi (i.e. approx. 2 weeks prior to the expected lambing date). The euthanasia protocol used was performed according with the Directive 2010/63/EU and the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013. Blood samples were obtained from the euthanized females while their fetuses were examined for lesions associated with the SBV infection. In addition, several tissues and body fluids considered as target for SBV detection (Bilk et al., 2012) were collected from the fetuses: brain, amniotic fluid, umbilical cord, lymphatic nodes, spleen, small intestine and meconium.

The three pregnant ewes allowed to lamb down were found to represent the lowest and the highest ELISA S/P ratios (20%, 34%, and 132%, respectively) when tested on day 0. Each one delivered one lamb, which were subsequently inspected for clinical signs or lesions indicative for the SBV infection. Lambs remained together with their mothers during the suckling period.

SBV challenge in lambs

The SBV challenge was then performed in lambs at approx. 3 months after birth the same way as described for adults (but using an inoculum volume of 15 ml). Blood samples were collected from the ewes and the lambs at 33 days prior to the inoculation. In addition, blood samples were taken daily from the lambs from 0 to 7 dpi, and subjected to further virological and serological analyses (i.e. RT-PCR, ELISA, and VNT).

Finally, blood samples were collected from both the ewes and their lambs at 10 days post inoculation and all animals were euthanized according to the approved protocol previously indicated. Several tissues were collected from the lambs: brain, lymphatic nodes, spleen and small intestine.

All the samples were sent to the BSL-3 facilities of VISAVET where they were properly identified, treated and stored at −80°C for further analysis. Tissue samples were homogenized in sterile PBS at 1 : 10.

Serological evaluation

All serum samples were tested for antibodies against SBV by indirect ELISA (ID Screen® Schmallenberg Virus, IDVet Innovative Diagnostics, Grabels, France) following the manufacturer's instructions. The plates of this assay are coated with the NP, so it tests for a subset of antibodies that differ to those required for virus neutralisation (i.e. targeted against the Gc). The ELISA results were expressed in S/P ratios. When the S/P ratio was below 60% the sample was considered to be negative, while a ratio over 70% was considered to be positive. All samples with a S/P ratio between 60% and 70% were considered to be doubtful results.

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

Neutralizing antibodies were measured by VNT. Fifty μl of DMEM were distributed into every well of 96-well cell culture plates. In the first well of two rows 50 μl of inactivated serum (56 $\pm$ 2°C, 30 min) were distributed; then, 2-fold serial dilutions were performed. Subsequently, 50 μl of a virus suspension containing 100 $TCID_{50}$ of a reference SBV virus were dispensed to all wells in the plate. Plates prepared this way were then pre-incubated for 1–2 h at 37 $\pm$ 2°C, minimum 5% CO_2. The serum-virus mixture was then transferred to a 96-well plate containing 1–2 day-old confluent Vero cells. Plates were incubated at 37 $\pm$ 2°C and under 5% CO_2 for 5 days. The presence or absence of the cytopathic effect (CPE) was determined by visual observation under an inverted microscope. The SN titer was defined as the highest dilution without evidence of the CPE. The results were expressed in $\log_2$ of the titers, in order to facilitate their interpretation. Samples with titers higher than 1/8 (i.e. 3 in $\log_2$) were considered to be positive.

The concordance between both tests was assessed by plotting the numerical results and by calculating the Cohen's kappa coefficient.

Virological evaluation

Prior to the analyses, SBV was extracted using Macherey-Nagel (Düren, Germany) RNA extraction kits (Nucleospin® RNA virus kit for serum samples and Nucleospin® RNA II kit for homogenates from tissue samples) according to the manufacturer's recommendations. The extraction products were stored at −20°C until they were analyzed by the real time RT-PCR (rRT-PCR) developed and distributed by the FLI (Bilk et al., 2012). All reactions were performed in an Eco Real-Time PCR Sytem (Illumina). The final testing was performed using 10 μl: 2 μl of RNA template, 5 μl of Kapa Probe Fast PCR Master Mix, 0.1 μl of RT Kapa SYBR Fast One-Step qRT-PCR (both from Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA), 100 nM of each primer and 200 nM of the SBV-specific probe. The temperature conditions used were 15 min at 42°C for RT and 5 min at 95°C for denaturalization, followed by 45 amplification cycles at 95°C for 3 s and 57°C for 30 s. We generated a quantified synthetic RNA standard in pGEM®-T vectors (Promega™, Madison, WI, USA) from available SBV sequences in order to quantify the RNA genome copies. A sample was considered to be negative when its C_t value was higher than 42.

Ethical approval

All procedures were carried out in accordance with the Code of Practice for Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures (2006), approved by the European Economic Community in 1986 (86/609/EEC) and amended by European Commission Directive 2003/65/EC. In addition, all the studies performed at Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L. facilities were approved in the ethical review process and authorization by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Site.

Results

Outbreak investigation

The first infections in the SBV-affected flock were estimated to occur in mid-November 2011. This estimation was based on the susceptible gestation period for AKAV-vertical infection that induces the typical CMFs, around days 30–70 of gestation (Parsonson et al., 1988). The birth of the first lamb suspected to be affected by SBV occurred at the beginning of the lambing season, so special attention was paid to detect any other similar cases in the farm and the surroundings. However, this was the only case notified to the OIE before the disease was proclaimed as 'non notifiable' in June 8th, 2012 (European Commission, 2012a). Of the samples collected from this herd in March 2012 for analysis by VNT in the LCV, most tested positive, which confirms the wide circulation of SBV in the flock.

Serological response

The majority of the 24 ewes selected for the experimental inoculation showed a serological response against SBV (Fig. 2). Although the ELISA S/P ratio varied between the animals (mean = 89.18%; 95% CI = 78.47–99.89) all temporal curves showed a similar pattern: a peak in mid-July, followed by a gradual decline in the antibody titers over time (Fig. 2a). This response could be due to a contact with the virus a few weeks before (approx. late June or early July), though this could not be proven. When the pregnant ewes were inoculated, four animals were seronegative and the result for another one was doubtful by the ELISA. Later, the antibody levels increased, and 15 dpi only one female remained doubtful (Fig. 2a).

The three ewes to carry their pregnancies to term and their lambs showed different immune responses. It should be mentioned that the lambs were allowed to suckle, so there could be maternally-derived antibody (MDA) transfer from the ewes, which could be measured by the serological techniques. Ewe #1 did not show positive serological result at any point (SP% = 0.11–69.23), while for her lamb (i.e. lamb #1) the first sample tested negative with a further decline of the actual titer after the inoculation. The results for the ewe #2 remained longer in the doubtful range (SP % = 34.00–86.00), becoming clearly positive only after the inoculation, though lamb #2 showed the values slightly higher than lamb #1. In contrast to these results, the ewe #3

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

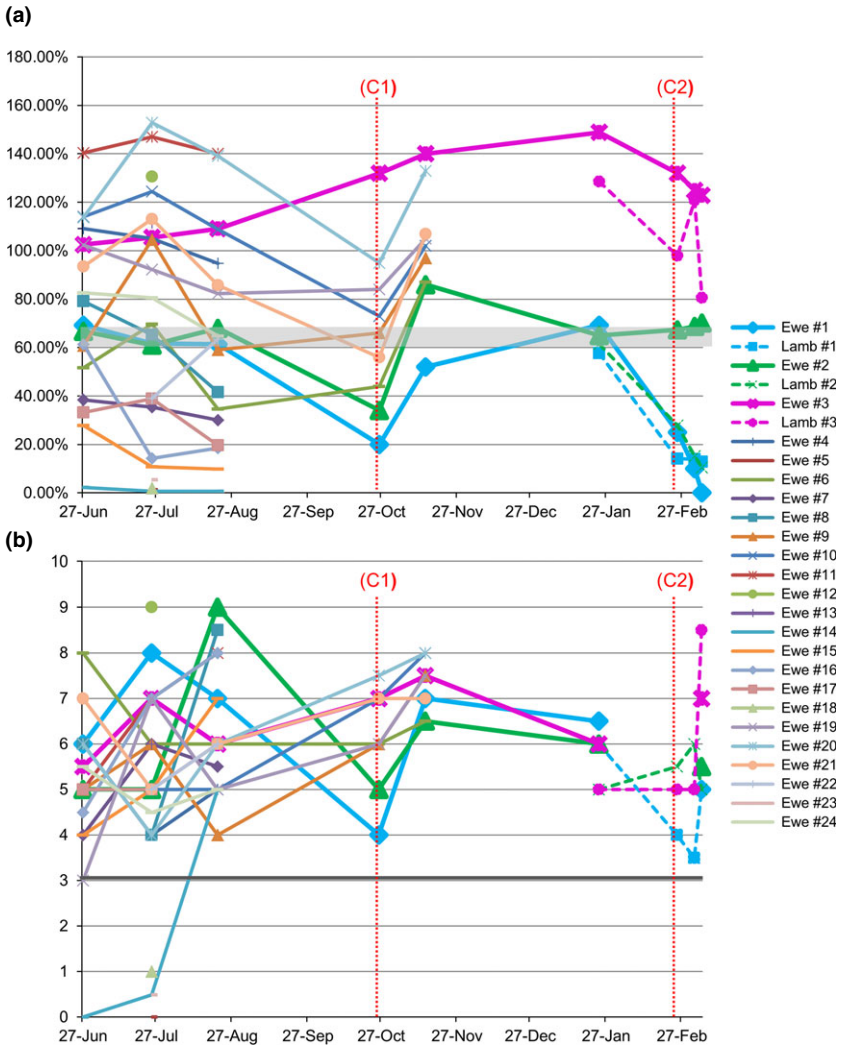


Fig. 2. Temporal evolution of the serological immune response of the ewes and lambs of the study against the Schmallenberg virus. The dotted lines indicate the date of challenge of the ewes (October 26th, 2012) (C1) and lambs (February 25th, 2013) (C2). (a) Results of the ELISA assay (in S/P ratios) obtained in the indirect ELISA (IDVet) are represented in the graph. The band in grey represents the range of values in which the samples are considered doubtful. Above the strip the samples are considered positive, and below negative. (b) Results of the virus neutralization test (VNT) (in $\log_2$ of the titers). The line in dark grey indicates the cut-off value to determine a sample as positive (above) or negative (below).

tested seropositive for the whole duration of the study, reaching high ratios (SP% = 102.57–148.85). Lamb #3 also showed the highest values, with a noticeable peak after the inoculation, and a similar decline pattern as observed in the other two lambs.

Similarly to the results observed in the ELISA, most of adult animals yielded positive results when tested using the VNT (Fig. 2b). In fact, all the ewes except two showed the presence of neutralizing antibodies since the beginning of the study. There were fluctuations in the titers of antibodies until the inoculation, when the nine pregnant ewes showed an increase in the titers (mean ± SD = 1.24 ± 0.85; Fig. 2b). The titers of the three ewes that continued until term were progressively decreasing. The three lambs showed the presence of neutralizing antibodies starting from their first samples (though 0.50–1.00 $\log_2$ lower than in their mothers). This finding in the first samples could be due to the MDA transfer. However, after the inoculation of the three lambs, an increase in the titers of neutralizing antibodies was observed, but varied between the animals (lamb #1 = 1 $\log_2$; lamb #2 = 0.50; lamb #3 = 3.50) similar to what was observed for the ELISA results.

No correlation was found between the results of the ELISA and the VNT, as showed in the plot (Fig. 3), and the Kappa coefficient (0.066). This was mainly caused by the titers of neutralizing antibodies in samples that yielded negative results in the ELISA (Fig. 3). Only samples testing negative in the VNT were also negative in the ELISA, with very low ratios (i.e. ranging from 0.73% to 5.40%), but not the other way round (Fig. 3).

Virological results

The RT-PCR assay showed to be well adapted to the plasmid standard dilutions. The slope ($S = -3.342$) of the standard curve correlated with the efficiency of the RT-PCR reaction ($E = 99.15\%$), according to the formula: $E = (10^{-1/\text{slope}})-1$, with an $R^2 = 0.984$. However, none of

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

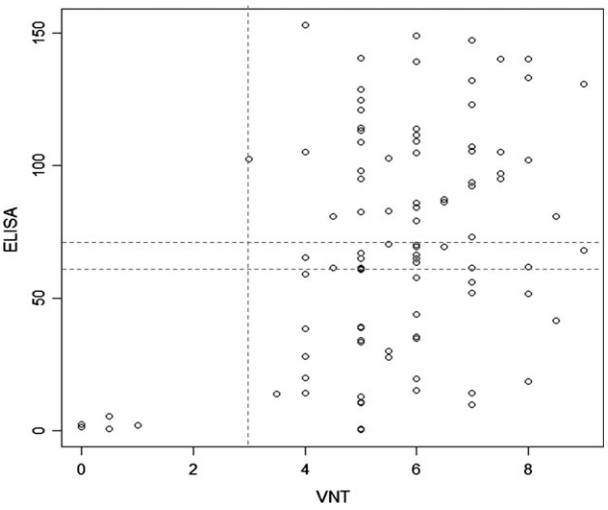


Fig. 3. Plot for comparison of the results of the ELISA (S/P ratios) and the virus neutralization test (titer $\log_2$). The blue lines represent the cut-off values for both tests.

the samples tested positive for SBV by the RT-PCR. This applied to the ewes during the entire study (i.e. before and after the experimental inoculation), as well as the fetuses (in tissues) and lambs (in sera and tissues). Likewise, no clinical signs were detected during the daily observations of ewes, and no lesions indicative of SBV infection were observed in the fetuses at the necropsy.

Discussion

Since the first reports of the SBD outbreaks in late 2011, twenty six countries all over Europe have been affected so far. In southern Europe, only Italy and Spain reported SBV outbreaks to the OIE in the first transmission season (i.e. late 2011-early 2012), though the virus has been found to be circulating in cattle and sheep in other areas of Spain, even before the detection of this only OIE-reported outbreak (Balseiro et al., 2013; Rojo Montejo et al., 2013; Astorga et al., 2014). In fact, samples from some other clinically suspicious cases were sent to the official laboratory (LCV) at this first stage, but they yielded negative results (MAGRAMA, personal communication). Despite the appearance of only one malformed fetus in the farm of the present study, most of the animals in that flock tested positive in the VNT, thus demonstrating the broad circulation of the SBV within that flock. This finding is consistent with the experience of other affected countries, with cases of herds/flocks in which most of the animals seroconverted after the incursion of the virus on the farm (Elbers et al., 2012; Méroc et al., 2013a).

Most of the samples from the study (i.e. all except for 5) yielded positive results in the ELISA and/or VNT. Although Bréard et al. (2013) observed a concordance at the level of approx. 99%, results of our study showed no correlation between the results of both assays (Fig. 3). A similar situation was observed by Laloy et al. (2014) in blood samples from deer, and by Wernike et al. (2013b) in samples from an investigation with prototype vaccines. The observed variations between both tests indicate that caution should be applied when interpreting the results from this ELISA, since a negative sample could present neutralizing antibodies, which would mean that the animal had contact with the virus.

Interestingly, no viral genome was detected in the animals at any time during the study. This includes the ewes during the entire study period (i.e. before and after the experimental inoculation), as well as the fetuses (in tissues) and lambs (in sera and tissues). The challenged animals in our study were inoculated with a dose of infectious plasma derived from sheep. In cattle, several alternatives to culture-passaged SBV have been successfully tested, such as infectious serum or blood, by both subcutaneous or IV administration routes (Hoffmann et al., 2012; Wernike et al., 2012). In sheep, as demonstrated by Wernike et al. (2013c), inoculation with either culture-passaged virus or infectious serum represents a suitable challenge approach. The serological results of our study indicate that infectious plasma obtained from naturally infected sheep could also successfully be used IV in challenge studies. We did expect to detect the SBV RNA in the inoculated animals, especially considering that Wernike et al. (2013c) observed an experimental viraemia in sheep between days 2 and 5 pi, although another assay failed to detect the SBV RNA after inoculation of seropositive cattle (Wernike et al., 2013a). In the present study, all selected ewes had previously been in contact with the virus. As known for other orthobunyaviruses, this contact could lead to the production of neutralizing antibodies that can clear the virus from the circulation (Hartley et al., 1977; Charles, 1994). As indicated by the results of the VNT, such antibodies were present in the blood of the sheep at the time of inoculation, and the contact with the SBV inoculum rapidly stimulated their production (Fig. 2b). This rapid neutralization of the virus has a considerable potential as a tool that could be used or prevention of the transmission and spread of SBV. This would suggest that the level of antibodies present in adult animals after natural infection would be sufficient to prevent the viraemia and, thereby, transmission of the virus to other susceptible animals by the vector.

Furthermore, none of the fetuses had lesions indicative of the infection by SBV nor tested positive for the RT-PCR. These results suggest that the immunity acquired by the pregnant sheep was also sufficient to prevent vertical transmission. However, it has to be borne in mind that the inoculation was undertaken later than the susceptible period for

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

the vertical transmission, and the subsequent development of CMFs as extrapolated from their pathogenesis during the infection with AKAV (Parsonson et al., 1988). In addition, as from day 75 of gestation, the fetus may start producing its own antibodies (Lievaart-Peterson et al., 2012) resulting in viral opsonization, followed by its removal by the immune system. This may be beyond our ability to detect the virus by RT-PCR, as was also observed in other studies reported from the Netherlands and Belgium (De Regge et al., 2013). In such a case, the best material for the virus detection might be the nervous system, given the high affinity of the SBV for the brain neurons (Hahn et al., 2013; Varela et al., 2013), especially those at the brainstem (Bilk et al., 2012; De Regge et al., 2013). However, in our study it was not possible to find SBV genome at this location.

Despite the constraints encountered (e.g. inoculation late during pregnancy, lack of availability of certain samples of interest, or variability of individual results) the findings of this study indicate that sheep naturally infected by SBV acquire an effective immune protection against reinfection, which may play an important role in the control of the disease spread within and between herds. However, the effect of maternal infection during the period of maximum susceptibility (i.e. 28–50 days of gestation) remains unknown. If the vertical infection was possible during that period, it could lead to a risk of SBV recirculation between naïve animals. In fact, Claine et al. (2013) have demonstrated the infection of 50 lambs born on a SBV-positive farm after the decline of the colostral antibodies (i.e. at 7–9 months of age). All these facts indicate that the potential application of vaccines to provide an effective immunity to the whole herd would be a valuable tool in the SBV control (Wernike et al., 2013b). Considering the variable immune responses following a natural infection (Fig. 2), vaccination would also induce a more homogeneous protection of the animals.

The SBV spread through Europe in such a short period of time has raised alarm internationally, leading to a clear impact on international trade (European Commission, 2012b). A relevant issue in order to certify the safety when moving animals between countries is to ensure the protection of the animal herds against infection. In the light of the results of this study, antibodies produced after natural infection can prevent reinfections, at least for several months. However, if extrapolated from knowledge of AKAV, re-emergence in cattle could occur in areas with a seropositivity even higher than 90% (Kirkland, 2002), while recent studies in Europe obtained seroprevalences ranging from 43.8% to 65.66% in herds and flocks located in the most affected areas of the first epidemic season (Helmer et al., 2013; Méroc et al., 2013b). Further investigations are needed to fully understand the epidemiology of the disease, such as the role of wildlife reservoirs in the maintenance of the epidemics, or the species of vectors truly involved in the transmission. Special attention should be also paid to new outbreaks in the following transmission season and in the areas not previously affected. Thus, all the scientific information that can be gathered about this new disease is useful to ensure the development of efficient means to protect the ruminant herds.

Acknowledgements

The authors would like to thank Belén Rivera for her excellent support in the laboratory, and Ana Cristina Pérez de Diego for her useful advices. It is also to mention the valuable technical support of Margarita Tarrats in the laboratory and Francesc Farguell in the animal facilities of Zoetis. We also acknowledge Prof. Martin Beer and the Friedrich-Loeffer Institute (FLI) for the kind donation of the SBV for the experimental inoculations. We would like to thank two anonymous referees for their valuable comments on the manuscript. The study was funded by the research agreement between VISAVET-UCM and Zoetis (formerly named Pfizer Animal Health). Víctor Rodríguez-Prieto holds an FPU pre-doctoral scholarship funded by the Spanish Ministry of Education and Science.

References

Afonso, A., J. Cortinas Abrhantes, F. Conraths, A. Veldhuis, A. Elbers, H. Roberts, Y. van der Stede, E. Méroc, K. Gache, and J. Richardson, 2014: The Schmallenberg virus epidemic in Europe-2011-2013. *Prev. Vet. Med.* doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.02.012.

Astorga, R. J., L. Reguillo, M. Hernández, F. Cardoso-Toset, C. Tarradas, A. Maldonado, and J. Gómez-Laguna, 2014: Serosurvey on Schmallenberg virus and selected ovine reproductive pathogens in culled ewes from Southern Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 4–11.

Balseiro, A., L. J. Royo, A. Gómez Antona, and J. F. García Marín, 2013: First confirmation of Schmallenberg virus in cattle in Spain: tissue distribution and pathology. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12185.

Bilk, S., C. Schulze, M. Fischer, M. Beer, A. Hlinak, and B. Hoffmann, 2012: Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet. Microbiol.* 159, 236–238.

Bréard, E., E. Lara, L. Comtet, C. Viarouge, V. Doceul, A. Desprat, D. Vitour, N. Pozzi, A. B. Cay, N. de Regge, P. Pourquier, H. Schirrmeier, B. Hoffmann, M. Beer, C. Sailleau, and S. Zientara, 2013: Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS ONE* 8, e53446.

Charles, J. A., 1994: Akabane virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10, 525–546.

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

Claine, F., D. Coupeau, L. Wiggers, B. Muylkens, and N. Kirschvink, 2013: Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1115–1117.

De Regge, N., T. Van den Berg, L. Georges, and B. Cay, 2013: Diagnosis of Schmallenberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. *Vet. Microbiol.* 162, 595–600.

European Food and Safety Authority (EFSA). 2013: Technical report on "Schmallenberg" virus: analysis of the epidemiological data (May 2013). Available at: http://http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/429e.htm (accessed June 22, 2014).

Elbers, A. R. W., W. L. A. Loeffen, S. Quak, E. de Boer-Luijtze, A. N. van der Spek, R. Bouwstra, R. Maas, M. A. H. Spierenburg, E. P. de Kluijver, G. van Schaik, and W. H. M. van der Poel, 2012: Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1065–1071.

Elliott, R. M., and G. Blakqori, 2011: Molecular biology of orthobunyaviruses. In: Plyusnin, A., and R. M. Elliott (eds), Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology, pp. 1–39. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

European Commission. 2012a: Statement of the Chief Veterinary Officers of the EU and of the European Commission on the Schmallenberg Virus Situation. Available at http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/schmallenberg_virus/docs/statement_cvo_june_en.pdf (accessed May 5, 2013).

European Commission. 2012b: List of third countries that impose import restrictions to EU products concerning Schmallenberg virus (SBV). Available at: http://babh.government.bg/uploads/File/Mejdunar_satr_vo/Aktualno/Schmallenberg%20virus%20-%20List%20of%20TCs%20with%20import%20restrictions%202012-08-27.pdf (accessed May 15, 2013).

Gerhauser, I., M. Weigand, K. Hahn, V. Herder, P. Wohlsein, A. Habierski, M. Varela, M. Palmarini, and W. Baumgärtner, 2013: Lack of Schmallenberg virus in ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany. *J. Comp. Path.* 150, 151–154.

Goller, K. V., D. Höper, H. Schirrmeier, T. C. Mettenleiter, and M. Beer, 2012: Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1644–1646.

Hahn, K., A. Habierski, V. Herder, P. Wohlsein, M. Peters, F. Hansmann, and W. Baumgärtner, 2013: Schmallenberg virus in central nervous system of ruminants. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 154–155.

Hartley, W. J., W. G. DeSaram, A. J. Della-Porta, W. A. Snowdon, and N. C. Shephard, 1977: Pathology of congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly and its relationship to Akabane virus. *Aust. Vet. J.* 53, 319–325.

Helmer, C., R. Eibach, P. C. Tegtmeyer, E. Humann-Ziehank, M. Runge, and M. Ganter, 2013: Serosurvey of Schmallenberg virus infections in sheep and goat flocks in Lower Saxony, Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12161.

Hoffmann, B., M. Scheuch, D. Höper, R. Jungblut, M. Holsteg, H. Schirrmeier, M. Eschbaumer, K. V. Goller, K. Wernike, M. Fischer, A. Breithaupt, T. C. Mettenleiter, and M. Beer, 2012: Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469–472.

Kirkland, P. D., 2002: Akabane and bovine ephemeral fever virus infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18, 501–514.

Laloy, E., E. Bréard, C. Sailleau, C. Viarouge, A. Desprat, S. Zientara, F. Klein, J. Hars, and S. Rossi, 2014: Schmallenberg virus infection among red deer, France, 2010-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 131–134.

Lievaart-Peterson, K., S. J. M. Luttikholt, R. van den Brom, and P. Vellema, 2012: Schmallenberg virus infection in small ruminants – First review of the situation and prospects in Northern Europe. *Small Rum. Res.* 106, 71–76.

Méroc, E., A. Poskin, H. van Loo, E. van Driessche, G. Czaplicki, C. Quinet, F. Riocreux, N. de Regge, B. Caij, T. van den Berg, J. Hooyberghs, and Y. van der Stede, 2013a: Follow-up of the Schmallenberg virus seroprevalence in Belgian cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12202.

Méroc, E., N. de Regge, F. Riocreux, A. B. Caij, T. van den Berg, and Y. van der Stede, 2013b: Distribution of Schmallenberg virus and seroprevalence in Belgian sheep and goats. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12050.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2013: Technical factsheet about Schmallenberg virus (February 2013 update). Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf (accessed July 8, 2013).

Parsonson, I. M., D. A. McPhee, A. J. Della-Porta, S. McClure, and P. McCullagh, 1988: Transmission of Akabane virus from the ewe to the early fetus (32 to 53 days). *J. Comp. Pathol.* 98, 215–227.

Veterinary Health Alert Network (RASVE). 2013. Practical manual of operations against the Schmallenberg disease – review January 2013 [in Spanish]. Available at: http://rasve.mapa.es/Recursos/Ficheros/Manuales/MARM/85_Manual%20SBV%20ENERO%202013.pdf (accessed April 16, 2014).

Rojo Montejo, S., J. M. San Miguel Ayanz, J. J. Vizuete Barrios, O. García Fariña, V. Navarro Lozano, E. Collantes Fernández, G. Adúriz, and L. M. Ortega Mora, 2013: Descripción de varios casos clínicos asociados a la infección por el virus de la enfermedad de Schmallenberg en ganado bovino en España. In: *Proceedings of XVIII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina*. 24–26th April 2013, pp. 196–198, ANEMBE, Lleida, Spain.

Taylor, W. P., and P. S. Mellor, 1994: The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol. Infect.* 113, 175–185.

Varela, M., E. Schnettler, M. Caporale, C. Murgia, G. Barry, M. McFarlane, E. McGregor, I. M. Piras, A. Shaw, C. Lamm, A. Janowics, M. Beer, M. Glass, V. Herder, K. Hahn, W. Baumgärtner, A. Kohl, and M. Palmarini, 2013: Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog.* 9, e1003133.

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

Wernike, K., M. Eschbaumer, A. Breithaupt, B. Hoffmann, and M. Beer, 2012: Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? *Vet. Res.* 43, 84. doi:10.1186/1297-9716-43-84.

Wernike, K., M. Eschbaumer, H. Schirrmeier, U. Blohm, A. Breithaupt, B. Hoffmann, and M. Beer, 2013a: Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 155–159.

Wernike, K., V. M. Nikolin, S. Hechinger, B. Hoffmann, and M. Beer, 2013b: Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine* 31, 3558–3563.

Wernike, K., B. Hoffmann, E. Bréard, A. Botner, C. Ponsart, S. Zientara, L. Lohse, N. Pozzi, C. Viarouge, P. Sarradin, C. Leroux-Barc, M. Riou, E. Laloy, A. Breithaup, and M. Beer, 2013c: Schmallenberg virus experimental infection of sheep. *Vet. Microbiol.* 166, 461–466.

Yanase, T., T. Kato, M. Aizawa, Y. Shuto, H. Shirafuji, M. Yamakawa, and T. Tsuda, 2012: Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch. Virol.* 157, 1611–1616.

© 2014 Blackwell Verlag GmbH • Transboundary and Emerging Diseases.

Objetivo 4

Caracterizar los factores de riesgo de ocurrencia de TB en la interfaz DS mediante la consideración de variables relacionadas con el ganado, la fauna silvestre y el medioambiente en un modelo espacial bayesiano.

Composición propia. Fuente de las imágenes originales:

1. Jabalí: 4028mdk09, 2010 [CC BY-SA 3.0]
2. Ciervo rojo: Smudge 9000, 2008 [CC BY 2.0]
3. Vacas y dehesa: imágenes propias

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 4

La **tuberculosis bovina** (TB) es una enfermedad infecciosa crónica principalmente causada por *Mycobacterium bovis*. Aunque su erradicación es prioritaria para la Unión Europea, la TB permanece activa e incluso en auge en varios países miembros, lo que se asocia a pérdidas económicas significativas. La consideración integral de los factores epidemiológicos de la enfermedad resulta crucial a la hora de aplicar las medidas sanitarias de la manera más eficaz y rentable posible. Así pues, el objetivo de este trabajo consistió en identificar la naturaleza y el alcance de la asociación entre la distribución de la TB y una lista de factores de riesgo potenciales relacionados con el ganado vacuno, los ungulados silvestres y ciertos aspectos medioambientales de Ciudad Real, que además de lo indicado anteriormente, es la provincia española con mayores tasas de prevalencia de rebaño. Para ello, se empleó un modelo bayesiano de regresión logística multivariable con efectos mixtos para predecir la ocurrencia de TB por municipio en 2007 utilizando información del año anterior. La enfermedad se encontraba principalmente concentrada en la parte occidental de la región, en la cual concurrían de manera clara varias variables identificadas en el modelo final: (i) granjas de vacuno incidentes, (ii) número de años en los que se habían inspeccionado los eventos de caza mayor en los cotos, (iii) prevalencia de TB en jabalíes, (iv) número de vacas muestreadas, (v) granjas de vacuno persistentemente infectadas, (vi) prevalencia en ciervo, (vii) proporción de granjas de carne y (viii) granjas dedicadas a la cría del toro de lidia. La combinación de estas ocho variables en el modelo final resaltó la importancia de la infección en los distintos hospedadores, los esfuerzos de vigilancia y la mayor exposición de algunos tipos productivos de ganado en la circulación de *M. bovis* en la región. La distribución espacial de estas variables junto con los elementos mediterráneos que favorecen esta interfaz DS pueden explicar la persistencia de la TB en esta región. Asimismo, el conocimiento de estos factores puede servir para enfocar de manera eficaz las acciones sanitarias para alcanzar el éxito en la erradicación de esta enfermedad en España.

Publicación principal de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J. A., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaino, J. M. y Vicente, J. (2012). **A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain**. *BMC Veterinary Research* 8, 148.

Aportaciones científicas relacionadas

➢ *Publicaciones científicas indexadas*

- Martínez-López, B., Barasona, J. A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2013). **Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain**. *Preventive Veterinary Medicine*. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.002

➢ *Congresos*

- Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J. A., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2012). **A Bayesian approach to study the risk variables for the interactions between domestic and wild ungulates for tuberculosis occurrence in South Central Spain**. Comunicación oral en la *13th Conference of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE)*, Maastricht (Holanda).
- Martínez-López, B., Barasona, J. A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2013). **Use of multilevel models to evaluate risk factors at the wildlife-domestic interface for bovine tuberculosis in South-Central Spain**. Comunicación oral en la *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM) Annual Meeting 2013*, Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid, Madrid.

Rodríguez-Prieto et al. BMC Veterinary Research 2012, 8:148
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/148

BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE Open Access

A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain

Víctor Rodríguez-Prieto[1*], Beatriz Martínez-López[1,2], José Ángel Barasona[2], Pelayo Acevedo[3,4], Beatriz Romero[1], Sabrina Rodriguez-Campos[1], Christian Gortázar[2], José Manuel Sánchez-Vizcaíno[1] and Joaquín Vicente[2]

Abstract

Background: Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic infectious disease mainly caused by *Mycobacterium bovis*. Although eradication is a priority for the European authorities, bTB remains active or even increasing in many countries, causing significant economic losses. The integral consideration of epidemiological factors is crucial to more cost-effectively allocate control measures. The aim of this study was to identify the nature and extent of the association between TB distribution and a list of potential risk factors regarding cattle, wild ungulates and environmental aspects in Ciudad Real, a Spanish province with one of the highest TB herd prevalences.

Results: We used a Bayesian mixed effects multivariable logistic regression model to predict TB occurrence in either domestic or wild mammals per municipality in 2007 by using information from the previous year. The municipal TB distribution and endemicity was clustered in the western part of the region and clearly overlapped with the explanatory variables identified in the final model: (1) incident cattle farms, (2) number of years of veterinary inspection of big game hunting events, (3) prevalence in wild boar, (4) number of sampled cattle, (5) persistent bTB-infected cattle farms, (6) prevalence in red deer, (7) proportion of beef farms, and (8) farms devoted to bullfighting cattle.

Conclusions: The combination of these eight variables in the final model highlights the importance of the persistence of the infection in the hosts, surveillance efforts and some cattle management choices in the circulation of *M. bovis* in the region. The spatial distribution of these variables, together with particular Mediterranean features that favour the wildlife-livestock interface may explain the *M. bovis* persistence in this region. Sanitary authorities should allocate efforts towards specific areas and epidemiological situations where the wildlife-livestock interface seems to critically hamper the definitive bTB eradication success.

Background

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic infectious disease that causes significant economic losses worldwide. *Mycobacterium bovis*, the main causative agent of the disease, is transmitted between a variety of domestic and wild animals, and humans [1]. *M. bovis* is primarily transmitted by aerosols and may persist for long periods in the environment, especially in moist and shady zones, such as the water points or the woodlands [2]. Due to its widespread distribution and the sanitary and economic impact, eradication of bTB is considered a priority in the European Union [3]. A great amount of personal and financial resources are invested every year in order to control the disease. Control and preventive sanitary programs for bTB eradication have been conducted for decades and traditionally focused on cattle, mainly consisting of culling reactor animals to the intradermal tuberculin test (IDTT). Despite these efforts, the disease remains prevalent or even increasing in many regions of the world, most likely associated to wild mammal reservoirs [4,5].

Several studies have highlighted the role of certain wildlife species as major reservoirs, depending on the ecosystem and the region of the world [6,7]. Among the

* Correspondence: victor@sanidadanimal.info
[1]VISAVET, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Puerta de Hierro s/n, Madrid 28040, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2012 Rodríguez-Prieto et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

wild mammals in Spain, the Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) and the red deer (*Cervus elaphus*) constitute the most important reservoirs, especially in Mediterranean areas, because they are able to maintain and efficiently transmit the agent in the absence of other domestic or wild hosts [8-10]. The implication of wildlife species in this multi-host cycle, in addition to many environmental and ecological factors, probably hampers the success in the control of bTB and makes the complete eradication of the disease currently not feasible [11-13].

Despite the national and long-lasting coverage of the bTB eradication plans in Spain, the prevalence of bTB varies considerably between regions [14]. In 2009, while disease presence was negligible in the islands and low in the North-East part of the country (prevalence between 0.21 and 0.91%), the herd prevalence in some regions of central, southern and western Spain was considerably higher, reaching values up to 10.27% in Castile-La Mancha [14-16]. There are several epidemiological circumstances that might be favouring this situation. First, cattle herds are farmed especially for beef (and to a lesser extent for bullfighting), comprising breeds of animals difficult to deal with due to their strong character. This kind of cattle is managed in extensive Mediterranean conditions in areas with difficult access, unfavourable topography and lack of resources, which makes it quite difficult to properly test all the animals of the herd. This also induces common grazing and a shared use of scarce water points (such as water holes), and thus, the contact of cattle with other domestic livestock such as sheep, goats, pigs [15] and wildlife [17]. Secondly, some areas, especially in the South Central regions, have experienced a great development in the recreational hunting industry, which leads to overabundance of wild ungulates in which sanitary programs cannot be implemented, leading to high prevalence of diseases [9,18]. All these aspects promote the existence of a wildlife-domestic livestock interface in Mediterranean habitats that could maintain a multihost environmental reservoir for *M. bovis* [11,13]. However, there is no research on the association between these factors and the status of bTB at either fine or large spatial scales.

In fact, regional variations in bTB eradication strategies through Spain are mainly based on the cattle animal/herd prevalence or incidence rates, data obtained from the National Programmes for bTB eradication [15]. The first contribution of the risk concept to the sanitary strategies appears in the literature only very recently [14], although there is a lack of inclusion and evaluation of wildlife-related risk factors. Moreover, the marked spatial variability in bTB risks indicates that we need detailed approaches in particular areas to evaluate different cattle management, environmental and biogeographical factors [19]. Characterization of risk factors for TB occurrence are crucial to more cost-effectively allocate financial and personal resources in order to improve the preventive, control and eradication measures in Spain and other regions with similar epidemiological conditions. Here we focus on an area from South Central Spain (Ciudad Real province) characterized by a complex epidemiological scenario for bTB, with the existence of a wildlife-domestic livestock interface under Mediterranean conditions and presence of abundant, widely distributed wild ungulate populations where TB is endemic and highly prevalent [9]. In this epidemiological context we used a Bayesian model to explore the nature and extent of the association between the distribution of *M. bovis* infection and potential risk factors in relation to cattle, wild ungulates and environmental aspects. This study is intended to guide policy makers towards risk-based and cost-effective TB eradication strategies.

Results

TB occurrence in Ciudad Real municipalities was spatially clustered in 2007, as indicated by the visual inspection of the spatial distribution of disease and the spatial cluster identified (RR = 12.88) (Figure 1). The model with no predictors (i.e. only with the intercept and structured and unstructured random effects) had a DIC of 101.74. The final model that best fitted the data (DIC = 72.32; $pD = 5.225$) included 8 variables (Table 1); three of them (namely, the proportion of cattle farms becoming bTB positive in 2006, the mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected, and the apparent prevalence of TB in wild boar in 2006) were statistically significant (95% CI) and positively (OR > 1) associated with TB occurrence (Table 1). The number of sampled animals in the cattle farms (i.e. proxy of the total census) included in the sanitary plan in 2006, the number of cattle farms with at least one bTB-positive animal in 2006, the number of TB-positive red deer in 2006, and the proportion of cattle farms classified as breeding farms in 2006 were marginally statistically significant (90% CI, OR > 1). The number of farms for bullfighting cattle appeared to improve to final model, although it was not highly significant. The spatial distribution of the variables included in the final model is shown in Figure 2.

The posterior probability of TB occurrence in Ciudad Real estimated by the best fitting model resembled the spatial structure of the disease observed in the data, with areas at the highest risk concentrated in the Northwest corner, the Southwest part and several municipalities in the southern stripe of the region (Figure 3). Both S_i and U_i were very low (median value of $-2.33 \cdot 10^{-3}$ and $-2.96 \cdot 10^{-4}$, respectively), which may indicate no

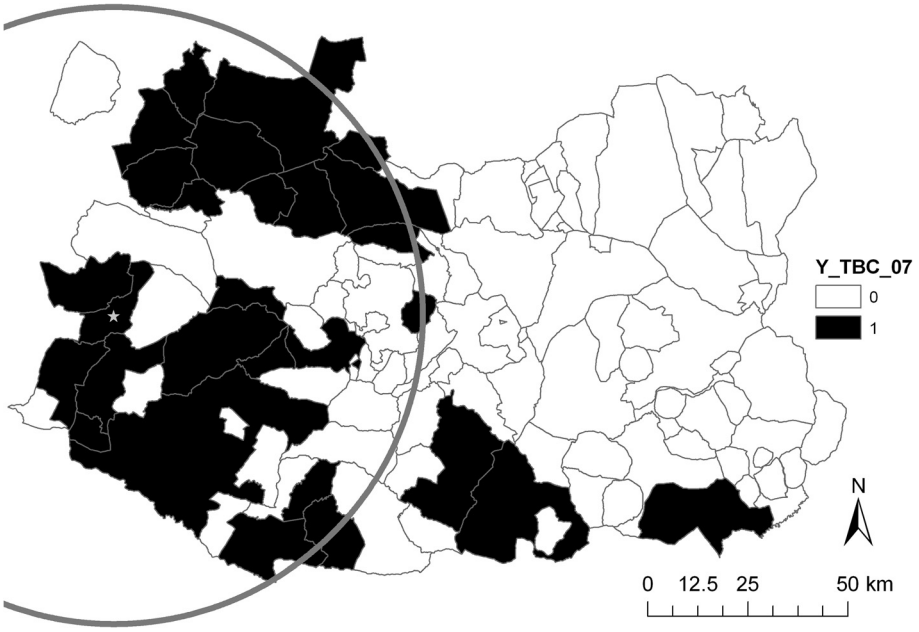


Figure 1 Spatial distribution of TB occurrence in Ciudad Real in 2007. The grey circle marks the significant cluster obtained by the Bernoulli model (star denoting its centre).

significant presence in the model of spatial autocorrelation and overdispersion over-and-above the risk factors identified, as well as a good fit of the model (Figure 4). In addition, convergence of the model was obtained after the first 200 iterations and no problems with autocorrelation were identified for the posterior inferences.

Discussion

In this study we aimed to explore the nature and extent of the association between potential risk factors and TB occurrence in wild ungulates and cattle in one of the most TB-prevalent regions of Spain referred to as Ciudad Real. The proportion of cattle farms becoming bTB

Table 1 Beta coefficients and Odds ratios for the final model.

	Type of variable	Beta coefficients			Odds ratios		
		Median	95% CI	90% CI	Median	95% CI	90% CI
Intercept		−1.07	[−1.53, -0.64]	[−1.42, -0.73]	0.34	[0.22, 0.53]	[0.24, 0.48]
Proportion of cattle farms becoming bTB positive from 2005 to 2006 (%)	QS	0.62[(a)(b)]	[0.06, 1.22]	[0.18, 1.09]	1.86[(a)(b)]	[1.06, 3.39]	[1.19, 2.97]
Mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected	QS	0.55[(a)(b)]	[0.09, 1.02]	[0.19, 0.91]	1.73[(a)(b)]	[1.09, 2.77]	[1.21, 2.49]
Apparent TB prevalence in wild boars in the municipality in the game season 2006-07	QS	0.66[(a)(b)]	[0.18, 1.28]	[0.27, 1.14]	1.94[(a)(b)]	[1.20, 3.59]	[1.32, 3.11]
Number of sampled cattle in the cattle farms included in the sanitary plan in 2006	QS	0.61[(b)]	[−0.05, 1.30]	[0.10, 1.14]	1.85[(b)]	[0.96, 3.66]	[1.10, 3.13]
Number of cattle farms with at least one bTB-positive animal in 2006	QS	0.66[(b)]	[−0.04, 1.38]	[0.11, 1.22]	1.94[(b)]	[0.96, 3.98]	[1.11, 3.40]
Number of "TB-positive" red deers in the municipality in the game season 2006-07	QS	0.53[(b)]	[−0.08, 1.22]	[0.05, 1.06]	1.69[(b)]	[0.93, 3.38]	[1.05, 2.90]
Proportion of cattle farms classified as extensive beef breeding farms in 2006 (%)	QS	0.39[(b)]	[−0.09, 0.87]	[0.01, 0.76]	1.47[(b)]	[0.92, 2.39]	[1.02, 2.14]
Number of farms devoted to bullfighting cattle in 2006	QS	0.14	[−0.24, 0.56]	[−0.16, 0.47]	1.15	[0.79, 1.76]	[0.85, 1.60]

(QS) = quantitative standardized variable; (D) = dichotomous variable (codified considering the median).
(a): Significant coefficients of the final model using the 95% CI.
(b): Significant coefficients of the final model using the 90% CI.

Rodríguez-Prieto et al. BMC Veterinary Research 2012, 8:148
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/148

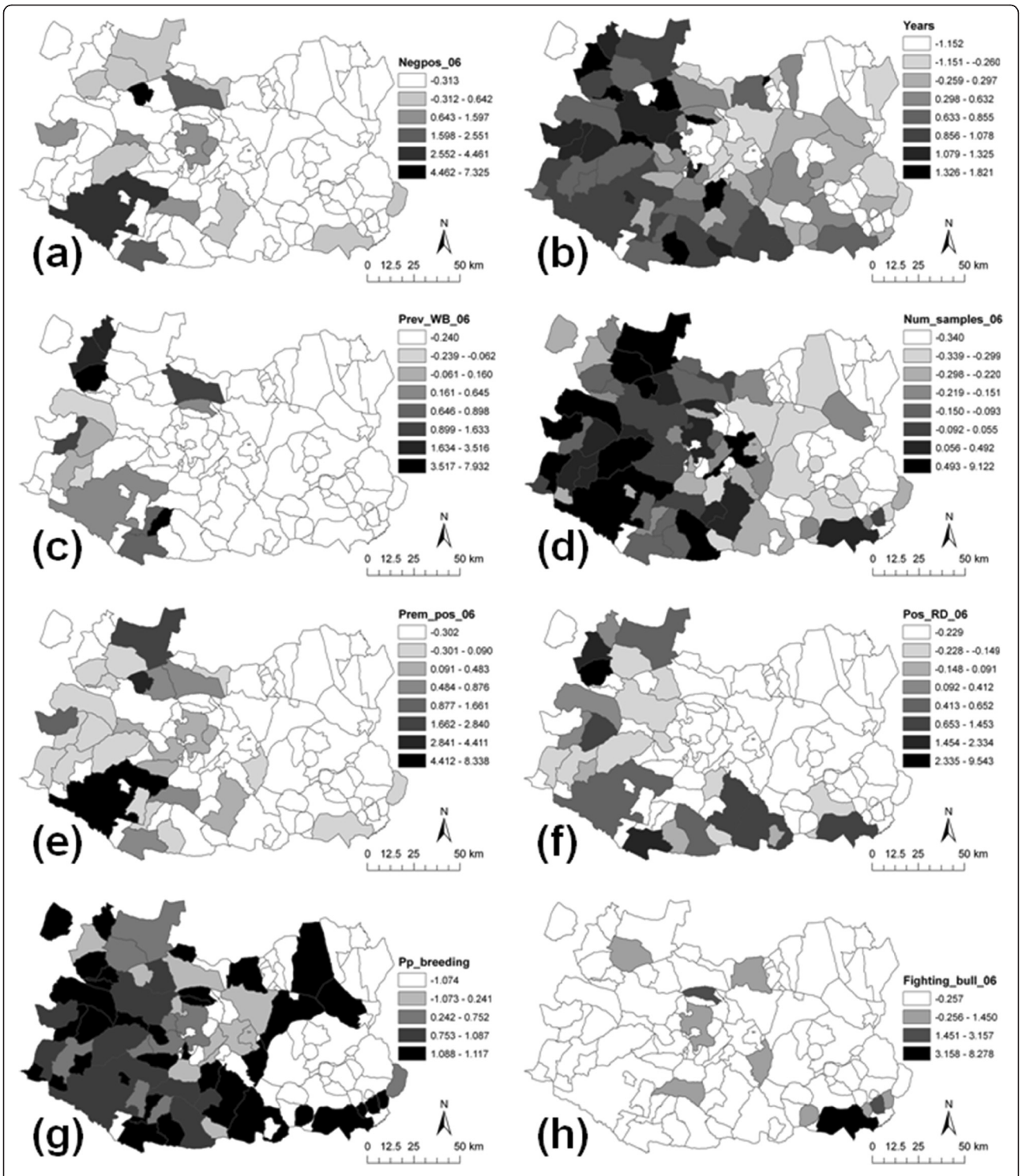


Figure 2 Spatial distribution of the eight variables retained in the final model. Namely, (**a**) the proportion of cattle farms becoming bTB-positive in 2006, (**b**) the mean of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected, (**c**) the apparent prevalence of TB in wild boar in 2006, (**d**) the number of sampled cattle in the cattle farms included in the sanitary plan in 2006, (**e**) the number of bTB-positive cattle farms in 2006, (**f**) the number of TB-positive red deer in 2006, (**g**) the proportion of cattle farms classified as breeding farms in 2006, and (**h**) the number of farms for bullfighting cattle in 2006.

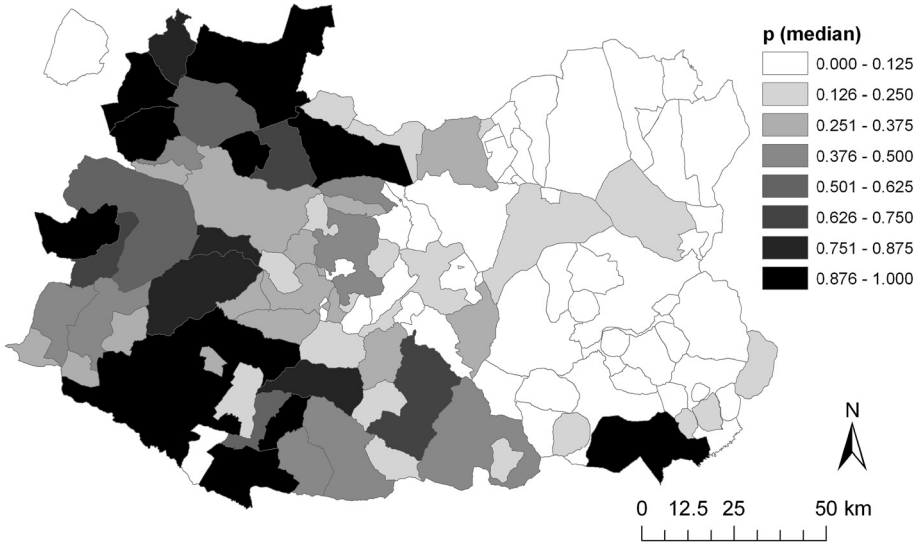


Figure 3 Posterior (predicted) probability (p_i) of TB occurrence in Ciudad Real estimated by the model.

positive in 2006, the mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected and the apparent prevalence of TB in wild boar in 2006 were identified as the most relevant factors related to the TB occurrence in 2007 in Ciudad Real. These factors are useful predictors in planning disease control strategies. Results revealed that both livestock- and wildlife-related factors determine TB presence at spatial scale. Overall, the major risk factor for TB incidence in any given year is whether it was present or not, and at what level, in the previous year.

The probability of TB occurrence in Ciudad Real resembled the biogeography of the province as well as game and cattle farming distribution, with areas at high risk concentrated in the municipalities with a higher proportion of forest or natural habitats (Toledo Mountains in the Northwest corner, the Guadiana valley in the East, and Sierra Morena in the South), and the highest big game activity. In fact, the mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected, which is an indicator of the hunting activity in the municipality, remained statistically significant in the model (see below). Usually, woodlands and savannah-like areas (locally called *dehesas*) are dedicated to big game, whereas marginal *dehesas* are located in the valleys in close proximity, where land is not appropriate for agriculture, are mainly dedicated to extensive livestock farming. This distribution, together with particular Mediterranean features that favour the wildlife-livestock interface (i.e. water areas or pasture sharing) may explain how TB could be transmitted from wildlife to livestock and vice versa (Figures 1 to 3). However, from this study we cannot infer the directionality of *M. bovis* transmission, i.e. whether wildlife reservoirs are infecting cattle, or whether cattle is the responsible of the circulation of *M. bovis* in both domestic and wild hosts. In fact, it could be the case that some municipalities with a high prevalence of TB in just one species (for example, wild boar) in 2007 may be purely correlated with a high prevalence of TB in only that species (in the example, with no red deer nor cattle infected in that municipality) the previous year. This would indicate no inter-species transmission in some regions. However, Ciudad Real municipalities with this scenario are an exception (9 out of 113) and many TB-infected regions presented TB cases in more than one species (44.19% in 2006 and 28.86% in 2007) (Table 2). This suggests a potential multi-species interaction scenario. Unfortunately, we cannot prove this because the final model did not include any interaction between variables related to hosts. Nevertheless, future studies should reveal whether the presence of the disease in wildlife is associated with increased presence of the disease in livestock and establish the directionality and extent of the TB inter-species transmission.

The finding that municipalities with a high proportion of cattle farms becoming bTB positive in 2006 were at high risk for TB occurrence in 2007 (OR = 1.86; 95% CI = 1.06-3.39) is an indicator that TB until 2007 repeatedly tends to appear in the same municipalities. These findings are in agreement with the trend of incidence and persistence of bTB in South Central Spain during 2006–2009, particularly in Ciudad Real, observed in previous studies [14]. This indicates the persistence of the pathogen over consecutive sanitary campaigns despite the eradication efforts and the culling of positive animals. Herd-level research is needed to elucidate whether barriers imposed to prevent the transmission of *M. bovis*

Rodríguez-Prieto et al. BMC Veterinary Research 2012, 8:148
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/148

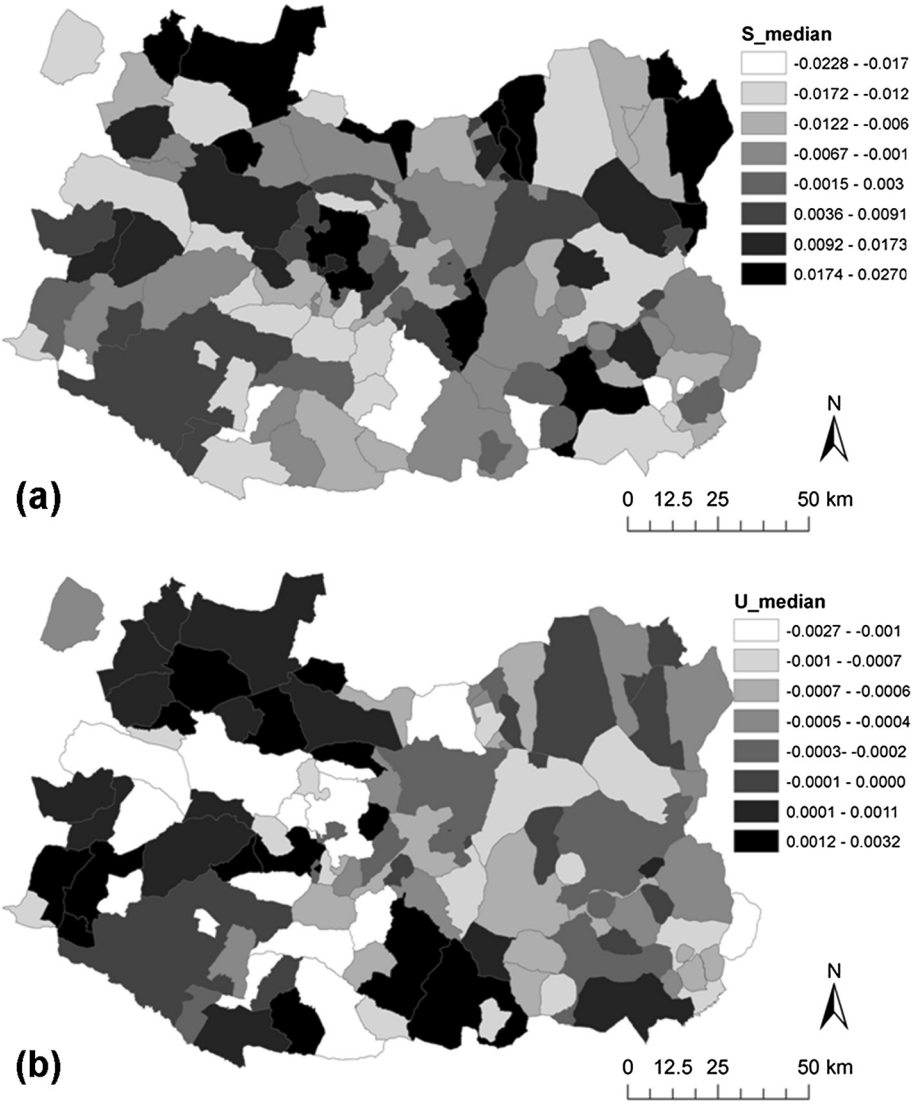


Figure 4 Distribution of the spatially (a) structured random effects (S_i) and (b) unstructured random effects (U_i) included in the Bayesian multivariate logistic regression mixed model for TB occurrence in Ciudad Real.

into bTB-free farms are not as efficient as expected, or diagnostics were not reliable enough in presumed free farms. Both of these risk factors have not been explored in this study. Most of the extensive farms and cattle census in Ciudad Real province are located in municipalities where some of the risk factors identified in this model may operate, such as wildlife TB reservoir abundance (see below). Although the TB inspection in Spain is compulsory in all cattle farms, these aspects also show that the efforts in controlling *M. bovis* infection in the whole cattle stock should not be relaxed, especially in extensive farms where enclosing and handling the whole stock is more difficult. Our final model suggests that the higher the number of cattle submitted to the sanitary

Table 2 Number of municipalities of Ciudad Real that were TB positive in 2006 and 2007 in either red deer (RD), wild boar (WB), cattle (Bov) or any of their combinations

	RD	WB	Bov	RD + WB	RD + Bov	WB + Bov	RD + WB + Bov	Total
TB positive in 2006	8	2	14	3	6	1	9	**43**
TB positive in 2007	3	1	16	3	4	0	1	**28**
Maintenance of the TB-positive status over the two years	1	1	7	2	4	0	1	**16**

campaigns, the higher the likelihood of the municipality to be TB positive the following year (OR = 1.94; CI = 1.11-3.40). As Brooks-Pollock and Keeling [20] reported, many elements associated with herd size could contribute to disease persistence within a herd, such as an increased number of movements or larger land coverage with increased risk of environmental contamination, or more densely stocked cattle. Nonetheless, this should be evaluated at the herd level.

Although the information regarding TB prevalence in wildlife is usually not available and more difficult to obtain than in cattle, we believe that it is also crucial to monitor the TB status of wild reservoirs in a region [19]. In fact, one of the significant covariates in the final model is the mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected (OR = 1.69; 90% CI = 1.19-2.42), which is related to the intensity and sustainability of the hunting activity performed in each estate over time, and therefore the abundance of big game. In addition, the analysis revealed two additional major risk factors related to wild hosts: the apparent prevalence of TB in wild boar (OR = 1.94; 95% CI = 1.20-3.59) and the number of TB-positive red deer (OR = 1.69; 90% CI = 1.05-2.90) both in the previous year. The implication of wild boar and red deer in the TB presence and maintenance in South Central Spain has been previously suggested [10]; the wild boar showing higher TB prevalence than red deer [9,21]. In addition, wild boar has been proposed as the most relevant wild host of *M. bovis* in Spain [10] becoming a true TB reservoir in the Iberian Peninsula [22]. This importance is enhanced by its abundance in Europe, the high levels of infection observed in this species, its ability to disseminatethe pathogen, its scavenging behaviour and, mostly, its potential ability for crossing fences and contacting with livestock [22]. Given this situation, physical biosafety practices may serve as a means to cost-effectively prevent contact between wild and domestic mammals and thus TB inter-species transmission. This is particularly useful in those areas where the hunting industry plays an important role in the local economy, such as Ciudad Real. Also, any action conducted to reduce TB prevalence and mycobacteria spreading in wild ungulates should contribute to reduce the *M. bovis* transmission risk at the wildlife-livestock interface. Options include the management of host density, spatial aggregations at supplementary feeding sites or waterholes, the safe disposal of carrion and viscera by hunters, and oral vaccination [5,21].

There is evidence supporting the inter-species circulation of *M. bovis* [13] and several studies have recently confirmed the presence of the same *M. bovis* spoligotypes in cattle and wild fauna sharing the same area [8,11,22-26]. *M. bovis* transmission between wild and domestic animals may occur directly via close contact, or indirectly via contamination of food or the environment with *M. bovis*. Most of the bTB control programmes in developed countries are mainly directed towards livestock not including wildlife, even where it is obviously involved in disease maintenance. The lack of integral control strategies is more evident in extensive cattle, which is the sector mostly exposed to wildlife contacts [15]. This was supported previously [16] and in our results, since the proportion of cattle farms classified as extensive beef breeding farms (OR = 1.47; 90% CI = 1.02-2.14) and the number of farms devoted to bullfighting cattle were revealed as risk factors in the final model (although this latter covariate is not highly significant, 90% CI = 0.97-1.87, probably because there are scarce and very disperse observations). Both types of farms are integrated in natural pasture agrosystems in close proximity with wildlife. However, the inclusion of these two covariates related to extensive cattle farming reinforces the idea that sanitary programs should incorporate the wildlife interface, especially in those cattle farms most exposed to *M. bovis* infection, as has been done in Spain since 2011 (http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp).

The Bayesian mixed effects multivariable logistic regression model was chosen as the best statistical approach to be used in this study. The reason is because the Bayesian methodology solves most of the problems faced by traditional statistical methods, e.g. the spatial autocorrelation, the potential dependence between the covariates or the incorporation of variables with few observations. The unit of analysis (i.e. municipality) was also considered adequate given the information that was available and the spatial level at which policies are taken. However, as any ecological study, some of the results may be biased as a consequence of the artificial grouping of observations and variables at the municipality level. In addition, differences in the municipality size may confound the interpretation of the maps, since the largest municipalities could appear at the highest risk only because they entail the majority of the observations [27]. Although variations in size among municipalities are not particularly large in the study area, we have used proportions in the majority of the covariates to minimize this problem. Despite these limitations, the approach used here is very useful for the exploration of spatially aggregated data and to highlight the most risky areas to perform more accurate analysis. The model proposed in this article is robust and consistent, as shown by the much lower DIC of the final model (72.32) and the small SD of S_i (0.1199) and U_i (0.0492). The robustness and consistence of this model allow to study the "TB hot spots" of the province in detail, since future epidemiological analyses at more local scale may be conducted.

Conclusions

In this study we used a Bayesian mixed effects spatial model that controlled for unobserved spatial and non-spatial heterogeneity over-and-above a set of risk factor variables considering environment, wildlife and cattle epidemiological factors. Overall, the major risk factor for TB incidence at any given year is whether or not it was present, and at what level, in the previous year. Our results support that cattle and big game (namely wild boar and red deer) are both involved in the *M. bovis* circulation in this region, evidencing a clustered distribution in the western part and an endemicity of the disease in many municipalities. In addition, some characteristics of management and surveillance in this region seem to be linked to TB occurrence. All these findings may guide sanitary authorities to conduct efforts towards specific areas and epidemiological situations where the wildlife-livestock interface seems to critically hamper the definitive success of the bTB eradication program. We believe that the inclusion of wild animals in control and eradication programmes, and the development of efficient biosafety practices in extensive farms should be a priority to eradicate the disease in livestock. Further studies are needed in order to understand the complex multi-host interaction at the farm level to more precisely evidence directionality of transmission and risks factors associated to TB.

Methods

Study area and unit of analysis

We performed the analysis in Ciudad Real province, South Central Spain (37° 13' 48" N to 39° 31' 43" N in latitude; 2° 25' 54" W to 6° 34' 06" W in longitude; 19,813 km^2) (Figure 5). Ciudad Real has been traditionally one of the provinces with the highest levels of herd prevalence and incidence of bTB [14,15]. This province is flanked by two important mountainous zones, the Toledo Mountains and Sierra Morena, which are connected by the Guadiana river valley, a fragmented Mediterranean agriculture habitat. In this province both extensive livestock production and hunting industry are important. The smallest administrative level used for the bTB-decision making process, i.e. municipality, was used as the spatial unit of analysis (Figure 5). The province of Ciudad Real is divided into 102 municipalities, whose mean area is 175.23 ± SD 178.35 km^2. For each municipality, we obtained data regarding TB sanitary status from 2002 to 2007, cattle and wild ungulate populations, management of farms/hunting estates and environmental factors (see below).

Data collection, case definition and exploratory cluster analysis

Information about bTB status in cattle was obtained from the official campaigns of 2002–2007 of the regional authorities. These campaigns, supported by the European Commission, are carried out in all the cattle farms of the province, including dairy, beef and bullfighting cattle. During these years, it was mandatory to perform the single IDTT, and all the reactors were culled [15]. In this context, all reactors to IDTT were considered "positive cases" in our study.

Data regarding wild ungulate (i.e. wild boar and red deer) abundance and TB presence were obtained from veterinary carcass inspection forms (from 1998–99 to 2007–08), which were also provided by the regional sanitary authorities. These forms register the number of animals shot per hunting event and the veterinary confiscation of carcasses due to macroscopic TB lesions at post-mortem examination [24]. Every carcass confiscated for this reason was considered to be a "positive case" of *M. bovis* infection in wild ungulates. From these reports, we also estimated an abundance population index for these wild species at municipality level and hunting pressure (see below).

We carried out an extensive literature review in order to capture and incorporate into the analysis the potential variables that may influence TB occurrence (i.e. risk or protective factors) (e.g. [2]). As a result, we gathered 50 variables (Table 3), which were grouped into three categories: (1) variables related to human demographics and environmental features; (2) variables related to wild ungulates; and (3) variables related to cattle herds. The first group of variables included the area of the municipalities, human-derived activity/presence (i.e. human population and density of roads) and water areas in each municipality. The second group included information concerning abundance of wild ungulates and the hunting pressure in each municipality. The relative abundances of wild boar and red deer at municipality level were calculated based on hunting yields (animals shot per municipality and hunting season). Hunting yields provide a coarse but feasible proxy of species abundance at broad spatial scales when absolute abundance values are lacking [28]. Within this group we also considered variables related to the inspection of TB in wild boar and red deer in the previous season (2006–07). The third category of variables included general information about the cattle sanitary plan developed in the municipality (i.e. number of cattle farms sampled, number of years in which the farms have been submitted to the plan, number of sampled animals) and variables related to the results of the bTB diagnostic test in cattle in the previous year (2006). This third category involved data about the animal species produced on farm (i.e. sheep, goats, pigs, or combinations of these three species with cattle), cattle movements per year (i.e. number of incoming movements, number of animals introduced on farm and average number of animals moved per shipment) and type of

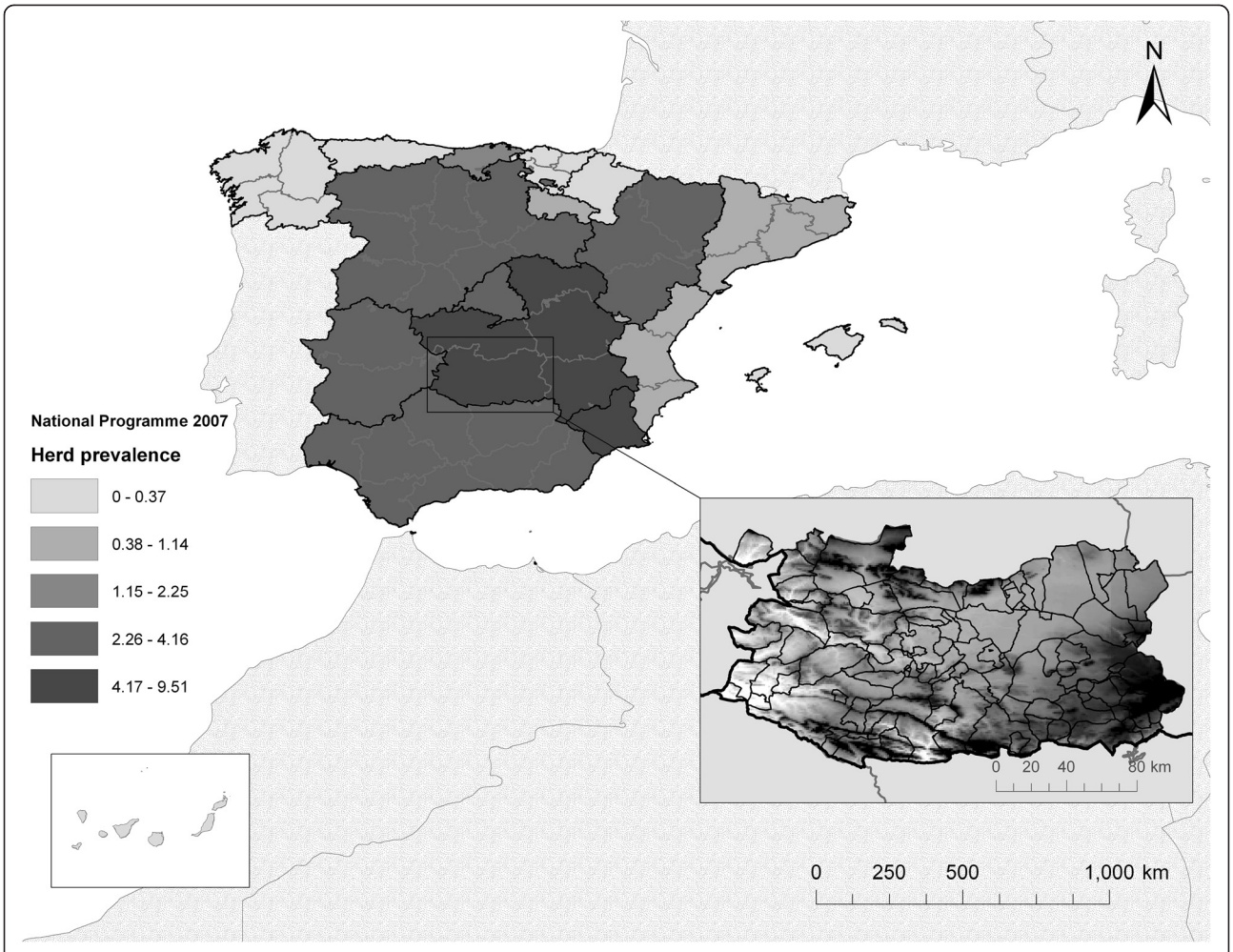


Figure 5 Situation of bTB herd prevalences in Spain in 2007. Autonomous Communities are marked in dark lines. In detail, the 102 municipalities of Ciudad Real (black lines), displayed in 113 polygons (because some municipalities are divided into several parts). The altitude of the province (ranging from 350 to 1261 m) is represented in a colour ramp (white to black); the highest areas are the Toledo Mountains (in the North), Sierra Morena (in the Southwest) and the southern part of the Central Plateau (in the East).

outdoor extensive production (i.e. breeding farms for meat production or farms for bullfighting cattle). In addition, this group contained data about the changes of the disease status of the farms in each municipality (i.e. becoming bTB positive/negative) from 2005 to 2006.

The study presented here was designed as a longitudinal study in order to account for the inherent chronic character of the *M. bovis* infection and to provide policy makers with methods and results useful for the design of the "next year" eradication programmes. As a result, we tried to predict the TB status per municipality in one particular year by using information from that municipality in the previous year. The assumption here was that significant changes in factors such as wildlife population, cattle-wildlife contacts, or cattle movements will most likely influence the TB status in the following year rather than in the same year, due to the chronic nature of the disease (which implies lower effective transmission rates and lower positive skin responses to the IDTT). We selected the year 2007 because it was the most recent year for which complete information was available and because it represented one of the years with a meaningful increase in the incidence and prevalence of the disease in cattle and wildlife [15,16]. In addition, we explored spatial clusters of Ciudad Real municipalities at high risk by using the Bernoulli model [29]. In order to implement this model, each observation, i.e. municipality, was associated with a 1/0 variable denoting presence/absence of TB cases. The computation of this scan statistic was based on the application of circles of candidate clusters throughout the province. Sizes of the circles were varied up to a maximum size equal to the 50% of the population at risk. The expected probability of TB occurrence in Ciudad Real, under the null hypothesis of being homogenously distributed throughout the province, was computed using Monte Carlo simulation and significance

Rodríguez-Prieto et al. BMC Veterinary Research 2012, 8:148
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/148

Table 3 List of variables used to fit the model for TB occurrence in Ciudad Real

Description of the variables	Polyserial correlation Rho			Phi coefficient			Source
	Quantitative standardized	Value	*p* value	Dichotomous	Value	*p* value[4]	
1. Area of the municipality (km^2)	Yes	0.343	<0.01	Yes	0.273	<0.01	A
2. Human population in the municipality in 2006 (persons)	Yes	−0.430	<0.01	**No[1]**	0.129	0.153	B
3. Male population in the municipality in 2006 (persons)	Yes	−0.427	<0.01	**No[1]**	0.129	0.153	B
4. Female population in the municipality in 2006 (persons)	Yes	−0.432	<0.01	**No[1]**	0.129	0.153	B
5. Area of water areas in the municipality (km^2)	Yes	0.023	<0.01	Yes	0.173	0.074	C
6. Area of rivers in the municipality (km^2)	Yes	0.456	<0.01	Yes	0.429	<0.01	C
7. Area of water areas and rivers in the municipality (km^2)	Yes	0.263	<0.01	**No[2]**	0.429	<0.01	C
8. Area of roads in the municipality (km^2)	Yes	0.256	<0.01	Yes	0.175	0.066	C
9. Proportion of water areas in the municipality (%)	Yes	0.010	<0.01	**No[1]**	0.111	0.248	*(C)
10. Proportion of rivers in the municipality (%)	**No[1]**	0.398	0.283	Yes	0.242	0.01	*(C)
11. Proportion of water areas and rivers in the municipality (%)	Yes	0.208	<0.01	**No[1]**	0.058	0.543	*(C)
12. Proportion of roads in the municipality (%)	**No[1]**	−0.078	0.235	**No[1]**	0.097	0.301	*(C)
13. Number of hunting estates in the municipality	Yes	0.615	<0.01	Yes	0.443	<0.01	D
14. Mean number of hunting seasons in which the hunting estates of the municipality have been inspected (max. 10 seasons)	Yes	0.593	<0.01	Yes	0.416	<0.01	D
15. Number of hunting events taking place in the municipality per hunting season 2006-07	Yes	0.512	<0.01	Yes	0.415	<0.01	D
16. Number of sampled red deer in the municipality in the hunting season 2006–07 – proxy of red deer relative abundance	Yes	0.408	<0.01	Yes	0.333	<0.01	D
17. Number of "TB-positive" red deer in the municipality in the hunting season 2006-07	Yes	0.588	<0.01	Yes	0.435	<0.01	D
18. Number of sampled wild boar in the municipality in the hunting season 2006–07 – proxy of wild boar relative abundance	Yes	0.344	<0.01	Yes	0.374	<0.01	D
19. Number of "TB-positive" wild boar in the municipality in the hunting season 2006-07	Yes	0.554	<0.01	Yes	0.406	<0.01	D
20. Apparent TB prevalence in red deer in the municipality in the hunting season 2006–07 (number of "TB-positive" animals/number of sampled animals)	Yes	0.559	<0.01	Yes	0.404	<0.01	*(D)
21. Apparent TB prevalence in wild boar in the municipality in the hunting season 2006–07 (number of "TB-positive" animals/number of sampled animals)	Yes	0.568	<0.01	Yes	0.406	<0.01	*(D)
22. Number of bovine farms in the municipality in 2006	Yes	0.667	<0.01	Yes	0.433	<0.01	D
23. Mean of the years in which the bovine farms of the municipality have been submitted to the sanitary plan (max. 6 years)	Yes	0.663	<0.01	Yes	0.441	<0.01	D
24. Number of sampled cattle in the cattle farms included in the sanitary plan in 2006	Yes	0.666	<0.01	Yes	0.569	<0.01	D
25. Number of bTB-positive cattle in the cattle farms included in the sanitary plan in 2006	Yes	0.501	<0.01	Yes	0.583	<0.01	D
26. Number of cattle farms with at least one bTB-positive animal in 2006	Yes	0.678	<0.01	**No[2]**	0.583	<0.01	D
27. Number of cattle farms with at least one bTB-positive animal relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.521	<0.01	**No[2]**	0.583	<0.01	*(D)
28. Apparent TB prevalence in the cattle farms of the municipality in 2006 (number of "TB-positive" animals/number of sampled animals)	Yes	0.237	<0.01	**No[2]**	0.583	<0.01	*(D)
29. Number of cattle farms becoming positive from 2005 to 2006	Yes	0.597	<0.01	Yes	0.504	<0.01	*(D)
30. Proportion of cattle farms becoming positive from 2005 to 2006 relative to the total number of sampled farms in both years (%)	Yes	0.523	<0.01	Yes	0.391	<0.01	*(D)

Table 3 List of variables used to fit the model for TB occurrence in Ciudad Real *(Continued)*

31. Number of cattle farms becoming negative from 2005 to 2006	Yes	0.414	<0.01	Yes	0.504	<0.01	*(D)
32. Proportion of cattle farms becoming negative from 2005 to 2006 relative to the total number of sampled farms in both years (%)	Yes	0.244	<0.01	Yes	0.391	<0.01	*(D)
33. Increment in the number of cattle farms becoming positive from 2005 to 2006 (number of farms becoming positive – number of farms becoming negative)	Yes	−0.081	<0.01	Yes	0.434	<0.01	*(D)
34. Number of farms devoted to bullfighting cattle in 2006	Yes	0.158	<0.01	**No[1]**	0.019	0.842	D
35. Proportion of farms devoted to bullfighting cattle in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	−0.027	<0.01	**No[1]**	0.019	0.842	*(D)
36. Number of cattle farms classified as extensive beef breeding farms in 2006	Yes	0.656	<0.01	Yes	0.562	<0.01	D
37. Proportion of cattle farms classified as extensive beef breeding farms in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.605	<0.01	Yes	0.466	<0.01	*(D)
38. Sum of animal entry movements in the cattle farms of the municipality in 2006	Yes	0.459	<0.01	Yes	0.425	<0.01	D
39. Number of animals moved in the animal entry movements in the cattle farms of the municipality in 2006	Yes	0.503	<0.01	**No[2]**	0.425	<0.01	D
40. Mean of animals moved in the animal entry movements in the cattle farms of the municipality in 2006	Yes	0.255	<0.01	**No[2]**	0.425	<0.01	*(D)
41. Number of cattle farms that also host goats in 2006	Yes	0.446	<0.01	Yes	0.344	<0.01	D
42. Number of cattle farms that also host sheep in 2006	Yes	0.620	<0.01	Yes	0.412	<0.01	D
43. Number of cattle farms that also host pigs in 2006	**No[3]**	0.508	<0.01	Yes	0.319	<0.01	D
44. Number of cattle farms that also host goats and pigs in 2006	**No[3]**	0.363	<0.01	Yes	0.234	0.017	D
45. Number of cattle farms that also host sheep and pigs in 2006	**No[3]**	0.454	<0.01	Yes	0.243	0.016	D
46. Proportion of cattle farms that also host goats in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.265	<0.01	Yes	0.344	0.001	*(D)
47. Proportion of cattle farms that also host sheep in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.236	<0.01	Yes	0.412	<0.01	*(D)
48. Proportion of cattle farms that also host pigs in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.127	<0.01	Yes	0.319	<0.01	*(D)
49. Proportion of cattle farms that also host goats and pigs in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.371	<0.01	Yes	0.234	0.017	*(D)
50. Proportion of cattle farms that also host sheep and pigs in 2006 relative to the total number of sampled farms in 2006 (%)	Yes	0.052	<0.01	Yes	0.243	0.016	*(D)

The variables were grouped into three categories: (1) variables for factors related to human demographics and environmental features (variables 1 to 12); (2). variables for factors related to wild animals (variables 13 to 21); and (3) variables for factors related to bovine herds (variables 22 to 50). Polyserial correlation's Rho values, phi coefficients and *p*-values were estimated to each candidate variables.
1: excluded variables because of a *p*-value > 0.10.
2: excluded dichotomous variables because they have the same values as other related variables, due to the variable transformation process.
3: excluded variables because they have few observations different from 0.
4: *p*-value obtained from the chi-square test.
A: ArcGIS estimation.
B: National Institute of Statistics (January 1st 2007).
C: Research Institute in Hunting Resources (IREC).
D: Castile-La Mancha region agriculture authorities.
*: Transformed from raw data.

(p-value < 0.05) of the candidate clusters was tested using a likelihood function [30].

Data transformation and standardization

Before starting with the statistical analysis we standardized each variable to reduce correlation between predictors and to homogenize the results [31]. We also used the dichotomous transformed version of the quantitative predictors (converted using the median as a cut-off point, i.e. 1 if above the median, or 0 if below the median) to evaluate if this transformation improved the model fit. We used two correlation tests to select the best predictors for the response variable (i.e. TB occurrence in 2007). Considering that the response variable is dichotomous, the polyserial correlation was used for the quantitative variables (using the package "polycor" of the R language) [32]. Similarly,

phi coefficients were calculated for the dichotomous variables (using the package "vcd" of the R language) [33]; significance of the phi values was evaluated using the chi-square test. Covariates correlated with the response variable in each test with a p-value > 0.10 were excluded from further analysis. In some cases different dichotomous variables had identical values, and thus the same relationship to the response variable. In this case we retained the least transformed or the most biologically significant ones, depending on the set of variables (see Table 3, exlusion criterion number 2). Thirdly, we excluded variables with few observations different from zero (i.e. less than 15%). As a result, a list of 81 potential risk factors or covariates was examined (Table 3).

Bayesian model approach

A Bayesian mixed effects multivariable logistic regression model [34] was used to evaluate the association between the occurrence of *M. bovis* infection per municipality i and k epidemiological factors hypothesized to influence disease status in the region (X_i):

$$\text{log}it(P_i) = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \ldots \beta_k X_{ki} + S_i + U_i$$

where, p_i denoted the posterior predicted probability of the municipality i to be TB positive, X_{1i} to X_{ki} indicated k candidate risk factors for the municipality i modelled as fixed effects with regression coefficients β_1 to β_k, respectively. Note that the response variable was whether or not *M. bovis* infection was detected in any animal (i.e. cattle, red deer or wild boar) in the municipality in 2007, which means that the *M. bovis* was present in that locality. Non-informative priors and hyper priors used were similar to those described in other works [31,35,36]. We used non-informative Normal priors defined by $\mu = 0$ and $\sigma^2 = 4$ for the intercept (β_0) and the regression coefficients of the covariates (β_k). The regression coefficients were set to show a lack of prior knowledge regarding the strength of any association between the covariates and the response variable. Spatially unstructured (U_i) and structured (S_i) random effects were included in the model to account for overdispersion and spatial autocorrelation [37]. We assumed for U_i a non-informative prior with mean = 0 and precision (τ_u) ~ Gamma (0.5, 0.0005). In order to model S_i, we used an intrinsic Gaussian autoregressive (CAR) structure, where the prior distribution of each S_i was dependent on the value of the response variable in every adjacent municipality [37] with a precision (τ_s) ~ Gamma (0.5, 0.0005). This structure allows the final risk of each municipality to be smoothed, conditional on the risk of every municipality sharing borders with it [31]. Gamma distributions for both precisions (τ_u and τ_s) were specified using a shape (r = 0.5) and a rate ($\mu = 0.0005$).

We fitted the model using WinBUGS 1.4 [38] with 30,000 iterations, after burning out the first 500. The model was built using a purely forward selection routine, by trying all possible combinations introducing one covariate at each time, and subsequently introducing interactions between the covariates included. The deviance information criterion (DIC) value was used to select the best final model [38]. DIC is a method of generalized use for Bayesian model choice. This consists of the posterior mean deviance and a term referred to as the "effective number of parameters" (pD) that accounts for a penalty for over-parameterization of the model. Lower DIC values are preferred, indicating a better model, while a high pD value indicates excessive parameters in the model. When one variable was retained in the final model, all the variables related to it (both statatiscally and biologically, and in both continuous and categorical forms) were excluded from the analysis and not subsequently evaluated. Once the inclusion of an additional covariate increased the DIC value of the model, we stopped at the previous model, considered to be the final one. This final model was checked to confirm absence of autocorrelation in the predictions. Convergence of the model was also explored by using Gelman-Rubin plots [39]. All results obtained were mapped using ArcGIS 9.2.

Abbreviations

bTB: Bovine Tuberculosis; IDTT: Intradermal Tuberculin Test; SD: Standard Deviation; S: Spatially Structured random effect; U: Spatially Unstructured random effect; DIC: Deviance Information Criteria; RR: Relative Risk; OR: Odds Ratio; CI: Credibility Interval.

Authors' contributions

VRP adapted the data, performed the model and drafted the manuscript. BML supervised the analysis and gave major advices about the methodology and interpretation of results. PA and JAB compiled the data on hunting bags and wildlife carcass inspection. BR and SRC compiled data and elaborated data on TB sanitary program in CLM, and together with PA also added value through introduction of critical technical considerations. JMSV, CG and JV were essential in the inter-institutional collaboration and contributed overall to the manuscript. All authors read, edit, review and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was funded by the research project FAU2008-00004-C03. Víctor Rodríguez-Prieto holds an FPU pre-doctoral scholarship and Beatriz Martínez-López holds a Juan de la Cierva post-doctoral contract, both funded by the Spanish Ministry of Education and Science. Jose Ángel Barasona enjoyed scholarship of the JCCM. Pelayo Acevedo holds a Beatriu de Pinós fellowship funded by "Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa" of the Generalitat de Catalunya, and the COFUND Programme - Marie Curie Actions under 7th Marc Programme of the European Community. We thank the Agriculture department of the JCCM and its Delegation in Ciudad Real by providing data on hunting statistics and sanitary campaigns. We also thank Jose Luis Saéz (Spanish Agriculture Ministry) and an anonymous referee for their valuable comments on the manuscript. This is a contribution to the EU FP7 TB-STEP grant 212414. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Author details
[1]VISAVET, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Puerta de Hierro s/n, Madrid 28040, Spain. [2]IREC Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n, Ciudad Real 13071, Spain. [3]Biogeography, Diversity and Conservation Research Team, University of Malaga, Málaga 29071, Spain. [4]Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) 08193, Spain.

Received: 10 January 2012 Accepted: 14 August 2012
Published: 30 August 2012

References

1. Thoen CO: **Tuberculosis**. In *Diseases of swine*. 9th edition. Edited by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Ames: Blackwell Publishing; 1984:807–816.
2. Humblet MF, Boschiroli ML, Saegerman C: **Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach.** *Vet Res* 2009, **40**:50.
3. Reviriego Gordejo FJ, Vermeersch JP: **Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union.** *Vet Microbiol* 2006, **112**:101–109.
4. Amanfu W: **The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest.** *Tuberculosis* 2006, **86**:330–335.
5. Gortazar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Galindo RC, Garrido J, Aranaz A, de la Fuente J: **Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife.** *Vet Microbiol* 2011, **151**:170–178.
6. Michel AL, Müller B, van Helden PD: ***Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: a problem, or not?** *Vet Microbiol* 2010, **140**:371–381.
7. Gortázar C, Delahay RJ, McDonald RA, Boadella M, Wilson GJ, Gavier-Widen D, Acevedo P: **The status of tuberculosis in European wild mammals.** *Mammal Rev*, in press.
8. Gortázar C, Vicente J, Samper S, Garrido JM, Fernández-de-Mera IG, Gavín P, Juste RA, Martín C, Acevedo P, de La Puente M, Höfle U: **Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from wild ungulates in south-central Spain.** *Vet Res* 2005, **36**:43–52.
9. Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-de-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C: **Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain.** *Vet Res* 2005, **37**:107–119.
10. Gortázar C, Torres J, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, de la Fuente J, Negro JJ, Aznar-Martín J: **Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds.** *PLoS One* 2008, **3**:e2776.
11. Aranaz A, de Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L: **Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:2602–2608.
12. Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J: **Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective.** *Eur J Wildl Res* 2007, **53**:241–256.
13. Gortazar C, Torres MJ, Acevedo P, Aznar J, Negro JJ, de la Fuente J, Vicente J: **Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife.** *BMC Microbiol* 2011, **11**:27.
14. Allepuz A, Casal J, Napp S, Saez M, Alba A, Vilar M, Domingo M, Gonzalez MA, Duran-Ferrer M, Vicente J, Alvarez J, Muñoz M, Saez JL: **Analysis of the spatial variation of bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006–2009).** *Prev Vet Med* 2011, **100**:44–52.
15. Anon: *National programme for bovine tuberculosis eradication*. in Spanish:; 2011. http://rasve.mapa.es/Publica/Programas.
16. Boadella M, Acevedo P, Vicente J, Ruiz-Fons JF, de la Fuente J, Gortazar C: *Spatio-temporal trends of Iberian wild boar contact with Mycobacterium tuberculosis complex detected by ELISA*. Ecohealth; in press.
17. Lutton CE, Beltran Beck B, Gortazar C, Vicente J, Hutchings MR, Moran D, White PCL: **Risk factors for the wildlife-livestock transmission of bovine tuberculosis in south central Spain.** *PLoS ONE, submitted*.
18. Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J: **Disease risks and overabundance of game species.** *Eur J Wildl Res* 2006, **52**:81–87.
19. Boadella M, Gortazar C, Acevedo P, Carta T, Martín-Hernando MP, de la Fuente J, Vicente J: **Six recommendations for improving monitoring of diseases shared with wildlife: examples regarding mycobacterial infections in Spain.** *Eur J Wildl Res* 2011, **57**:697–706.
20. Brooks-Pollock E, Keeling M: **Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle farms in Great Britain.** *Prev Vet Med* 2009, **92**:360–365.
21. Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Acevedo P, Juste R, Barral M, Gortazar C: **Risk factors associated with prevalence of tuberculosis-like lesions in wild boar and red deer in South Central Spain.** *Vet Res* 2007, **38**:451–464.
22. Naranjo V, Gortázar C, Vicente J, de la Fuente J: **Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of tuberculosis due to *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Vet Microbiol* 2008, **127**:1–9.
23. Parra A, Larrasa J, García A, Alonso JM, de Hermoso Mendoza J: **Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis.** *Vet Microbioy* 2005, **110**:293–300.
24. 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-Larío P, Hermoso De Mendoza M: **Bovine tuberculosis in wild boar (Sus scrofa), red deer (Cervus elaphus) and cattle (Bos taurus) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004).** *Prev Vet Med* 2006, **74**:239–247.
25. Romero B, Aranaz A, Sandoval A, Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Sánchez C, Galka M, Fernández P, Mateos A, Domínguez L: **Persistence and molecular evolution of Mycobacterium bovis population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation.** *Vet Microbiol* 2008, **132**:87–95.
26. 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: **High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe.** *Vet Microbiol* 2010, **141**:89–95.
27. Pfeiffer D, Robinson T, Stevenson M, Stevens K, Rogers D, Clements A: **Spatial variation in risk**. In *Spatial Analysis in Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 2008:67–80.
28. Acevedo P, Farfán MA, Márquez AL, Delibes-Mateos M, Real R, Vargas JM: **Past, present and future of wild ungulates in relation to changes in land use.** *Landscape Ecol* 2011, **26**:19–31.
29. Kulldorff M: *SatScan user guide 2006*. 2011. www.satscan.org. Accessed 29 November.
30. Kulldorff M, Nagarwalla N: **Spatial disease clusters: Detection and inference.** *Stat in Med* 1995, **14**:799–810.
31. Chhetri BK, Perez AM, Thurmond MC: **Factors associated with spatial clustering of foot-and-mouth disease in Nepal.** *Trop Anim Health Prod* 2010, **42**:1441–1449.
32. Fox J: *Polychoric and Polyserial Correlation. R package 2010, version 0.7-8*. 2010. http://cran.r-project.org/web/packages/polycor/polycor.pdf. Accessed 26 March.
33. Meyer D, Zeileis A, Hornik K, Friendly M: *Visualizing Categorical Data. R package 2012, version 1.2-13*. 2012. http://cran.r-project.org/web/packages/vcd/vcd.pdf. Accessed 26 March.
34. Besag J, York J, Mollie A: **Bayesian image restoration with applications in spatial statistics.** *Ann Inst Stat Math* 1991, **43**:1–20.
35. Wakefield JC, Best NG, Waller L: **Bayesian approaches to disease mapping**. In *Spatial epidemiology: methods and applications*. Edited by Elliot P, Wakefiled JC, Best NG, Briggs DJ. New York: Oxford University Press; 2000:104–127.
36. Stevenson MA, Morris RS, Lawson AB, Wilesmith JW, Ryan JBM, Jackson R: **Area-level risks for BSE in British cattle before and after July 1988 meat and bone meal feed ban.** *Prev Vet Med* 2005, **69**:129–144.
37. Pfeiffer D, Robinson T, Stevenson M, Stevens K, Rogers D, Clements A: **Identifying factors associated with the spatial distribution of disease**. In *Spatial Analysis in Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 2008:81–109.
38. Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best NG, Lunn D: *WinBUGS Version 1.4 Users Manual 2003*. Cambridge: MRC Biostatistics Unit; 2011. http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs Accessed 2 December.
39. Lawson AB, Browne WJ, Rodeiro CLV: *Disease Mapping with WinBUGS and MLwiN*. Chichester: John Wiley and Sons; 2003.

doi:10.1186/1746-6148-8-148
Cite this article as: Rodríguez-Prieto *et al.*: A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC Veterinary Research* 2012 **8**:148.

Objetivo 5

Valorar la utilización de dos enfermedades víricas (SRRP y DVB) como marcadores de contacto y transmisión de patógenos en la interfaz DS utilizando técnicas diagnósticas directas e indirectas, así como modelos epidemiológicos para desentrañar factores de riesgo relacionados.

Composición propia. Fuente de las imágenes originales: cedidas por Joaquín Vicente (IREC)

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 5

Castilla-La Mancha, y en concreto Ciudad Real, ocupa una de las zonas de España que alberga más explotaciones animales de carácter extensivo, aprovechando las características orográficas y vegetales. Además, esta región tiene una fuerte tradición cinegética, lo que se traduce en la presencia de numerosos cotos de caza. En este ambiente resulta factible el contacto de ambos tipos de animales, lo que facilita la transmisión de patógenos en esta interfaz DS. Sin embargo, resulta difícil caracterizar el patrón de contactos y la interacción entre individuos, así como conocer cuáles son los patógenos que tienen más posibilidades de éxito en estas situaciones. Por ello, se planteó seleccionar dos enfermedades víricas para ver su importancia en este aspecto y aplicar en ellas herramientas diagnósticas y epidemiológicas que permitieran descubrir su valor como **marcadores de contacto en la interfaz DS**.

El **síndrome respiratorio y reproductor porcino** (SRRP) es una enfermedad infecciosa de los cerdos responsable de causar serios problemas económicos en la industria porcina a nivel internacional. La infección asociada al virus del SRRP (VSRRP) es típica del porcino intensivo, aunque también se ha detectado en jabalíes. Sin embargo, el papel epidemiológico que pueden jugar tanto el jabalí como el cerdo en extensivo sigue sin esclarecerse. Así pues, el objetivo de este estudio fue determinar la ocurrencia del SRRP en jabalíes y cerdos ibéricos en un ecosistema de dehesa. En primer lugar se realizó un análisis geoespacial de datos procedentes de publicaciones científicas para explorar la asociación entre la densidad de cerdo doméstico y la ocurrencia del SRRP en jabalíes en el entorno europeo. Pese a no encontrarse diferencias significativas, se observó una tendencia a detectar el VSRRP en regiones con alta densidad porcina. En segundo lugar, se analizaron sueros de 294 jabalíes y 80 cerdos ibéricos mediante ELISA indirecto. Además, todas las muestras de suero y 27 muestras de tejido de jabalí se analizaron mediante dos ensayos de RT-PCR en tiempo real, diseñados para amplificar los dos genes más conservados del VSRRP, el ORF1 y el ORF7. De todos los animales analizados, solo siete jabalíes (2,4%) y un cerdo ibérico (1,3%) dieron resultados positivos al ELISA, aunque ninguna muestra resultó positiva a la RT-PCR. Estos resultados confirman la limitada difusión del virus entre poblaciones

de jabalíes y cerdos ibéricos en contacto. Se requerirían más estudios para determinar si la baja seroprevalencia encontrada en estas poblaciones se debe a contactos de estas con cerdos en intensivo o existe una circulación independiente de cepas específicas en estos hospedadores.

A su vez, el virus de la **diarrea vírica bovina** (VDVB) es un pestivirus que afecta la producción mundial de vacuno, aunque otros ungulados como los cérvidos (e incluso los jabalíes) pueden infectarse con el virus. En este trabajo se estudió la epidemiología compartida del VDVB entre 267 individuos de ciervo común y 52 jabalíes de 19 poblaciones cinegéticas, así como 18 granjas de vacuno de las proximidades. Como técnicas diagnósticas, se usaron varios ELISAs para la determinación de anticuerpos y un ensayo de RT-PCR mediante sonda Taqman para la detección del virus, seguido de un análisis filogenético de 17 muestras positivas. Así, se detectaron 52 muestras de ciervo (19,5%) y 82 de vacuno (48,2%) seropositivas. A su vez, se obtuvo una alta prevalencia aparente en ciervo (39,7%) mientras que solo cinco *pools* de sueros de vacuno dieron positivo a RT-PCR. Todas las secuencias estudiadas se relacionaron filogenéticamente con el subgrupo 1b del VDVB, aunque cuatro procedentes de ciervo y cinco *pools* de vacuno formaron una subrama dentro del subgrupo. Esto sugiere que podría haber una cepa común que estuviera infectando a ambas poblaciones. Además, se confirmó la relación entre la posibilidad de obtener muestras de vacuno positivas al VDVB y la abundancia de ciervo en las inmediaciones de las explotaciones mediante un modelo generalizado linear mixto. Todos estos hallazgos apuntan a una epidemiología compartida del VDVB en esta interfaz, mediada por contacto interespecífico. Por tanto, este virus presenta un importante potencial para utilizarse como marcador sanitario para la vigilancia de estos hábitats compartidos. Aun así, queda esclarecer el papel del ciervo como reservorio del VDVB.

Publicaciones principales de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Barasona, J. A., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2013). **Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain**. *European Journal of Wildlife Research* 59(6), 859-867.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Rivera-Arroyo, B., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (en revisión). **Molecular evidence of shared BVD epidemiology between red deer and extensive cattle in South Central Spain**. *Veterinary Microbiology*.

Aportaciones científicas relacionadas

➢ *Publicaciones científicas indexadas*

- Kukielka, D., Rodríguez-Prieto, V., Vicente, J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión). **Constant HEV circulation in wild boar and red deer in Spain: an increasing concern source of HEV zoonotic transmission**. *Zoonoses & Public Health*.

➢ *Publicaciones científicas de divulgación*

- Rubio García, A., Rodríguez Prieto, V., Kukielka Zunzunegui, D. y Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J. M. (2007). **Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS**. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1(2), 646-653.

➢ *Congresos*

- Rubio, A., Rodríguez, V., Kukielka, D., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2006). **Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS**. Comunicación oral en el *VI Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.
- Espinosa, L., Rodríguez, V., Martínez, B. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2010). **Detección de puntos críticos en explotaciones de porcino extensivo en relación con la vida silvestre**. Comunicación oral en *el IX Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Medicina de la UCM, Madrid.

- Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Barasona, J. A., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2012). **Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in South Central Spain**. Comunicación oral en el *IX International Congress of European Society of Veterinary Virology (ESVV)*, Facultades de Veterinaria y Medicina de la UCM, Madrid.

Eur J Wildl Res
DOI 10.1007/s10344-013-0739-2

ORIGINAL PAPER

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain

Víctor Rodríguez-Prieto · Deborah Kukielka · Beatriz Martínez-López · Ana Isabel de las Heras · José Ángel Barasona · Christian Gortázar · José Manuel Sánchez-Vizcaíno · Joaquín Vicente

Received: 25 June 2012 / Revised: 24 April 2013 / Accepted: 14 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a swine infectious disease causing major economic problems on the intensive pig industry. This virus has been reported worldwide in domestic pigs and there is evidence of PRRS virus (PRRSV) infection in wild boar (*Sus scrofa*). Nonetheless, the epidemiological role of wild boar and extensively kept domestic pigs remains unclear. The aim of this study was to determine the occurrence of PRRS in wild boar and Iberian pigs in the dehesa ecosystem of the Castile-La Mancha region of Spain, which boasts one of the most important free-roaming porcine livestock and hunting industries in the country. Using geo-spatial analysis of literature data, we first explored the relationship between domestic pig density and PRRS occurrence in wild boar in Europe. Results revealed that PRRS occurrence in wild boar may be influenced, albeit not significantly, by domestic pig density. Next, we analyzed sera from 294 wild boar and 80 Iberian pigs by indirect enzyme-linked immunosorbent assay for PRRSV antibodies. The sera and 27 wild boar tissue samples were analyzed by two real-time RT-PCR assays, targeting the most conserved genes of the PRRSV genome, ORF1 and ORF7. Seven wild boar (2.4 %) and one Iberian pig (1.3 %) were seropositive, while none of the animals tested positive for PRRSV by RT-PCR. Our results confirm the limited spread of PRRSV in free-roaming Iberian pigs and wild boar living in mutual contact. Further studies would be necessary to address whether this low seroprevalence found in these animals reflects transmission from intensively kept pigs or the independent circulation of specific strains in free-roaming pigs.

Keywords PRRS · Wild boar · Iberian pigs · RT-PCR · ELISA · Free roaming · Dehesa

Communicated by C. Gortázar

V. Rodríguez-Prieto (✉) · D. Kukielka · B. Martínez-López · A. I. de las Heras · J. M. Sánchez-Vizcaíno
VISAVET, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Puerta de Hierro s/n,
28040, Madrid, Spain
e-mail: victor@sanidadanimal.info

B. Martínez-López · J. Á. Barasona · C. Gortázar · J. Vicente
IREC Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCLM), Ronda de Toledo s/n,
13080, Ciudad Real, Spain

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the infectious diseases with the greatest economic impact on the international swine industry (Cho and Dee 2006). PRRS is caused by the PRRS virus (PRRSV), a single-stranded RNA virus of the family *Arteriviridae*, genus *Arterivirus*. Its genome is composed of seven open reading frames (ORFs). The largest and most conserved ones are ORF1a and 1b, which encode the viral RNA polymerase, and ORF7, which encodes the nucleocapsid protein. ORF5, encoding the major viral envelope protein, shows antigenic variability enabling it to evade the immune system (Lunney et al. 2010). Phylogenetic analyses have revealed that this virus is divided into two major genotypes which show approximately 50 % sequence divergence: the European (EU) type 1 and the North American (US) type 2 (Nelsen et al. 1999; Shi et al. 2010). In fact, the genetic diversity within EU PRRSV strains has led to classify them into four distinct subtypes, showing important divergence that could even affect vaccination (Stadejek et al. 2006).

Published online: 30 May 2013

Both genotypes are associated with the same syndrome characterized by reproductive failure in pregnant sows and respiratory problems in newborns, while grower-finishers may suffer mild disease that is often unapparent (Zimmerman et al. 2012). Swine are the only confirmed hosts of these viruses, yet no clinical manifestations have been reported in wild boar (Ruiz-Fons et al. 2008).

PRRSV can be transmitted by many routes, since it is present in all secretions and excretions of infected animals. Direct routes, including venereal transmission, seem to be the most common and most effective (Cho and Dee 2006). Transmission is facilitated in intensive production systems with high herd density, frequent animal movements, and use of artificial insemination (Zimmerman et al. 2012). PRRSV prevalence in intensive farms may reach high values (Zimmerman et al. 2012), and Albina et al. (2000) even found that farm-raised wild boar showed a PRRSV seroprevalence four times higher than free-ranging ones. Conversely, indirect transmission pathways (e.g., fomites, iatrogenic routes, or even insect vectors) seem to be less effective, probably due to the low resistance of the pathogen in the environment (Zimmerman et al. 2012). As a result, low infection rates are expected in extensive management systems, like those involving Iberian pigs, as well as in wild boar populations.

In Spain, as in many European countries, wild boar populations have notably increased in recent decades (Acevedo et al. 2006). The main reason for this, at least in south-central Spain, is the increased intensive management of wild boar populations for hunting purposes (Vicente et al. 2004). Such farms feature a high density of animals, yet they lack proper biosecurity measures to prevent disease introduction and spread.

Extensive Iberian pig farming in the southwestern Iberian Peninsula occupies a large proportion of agricultural land. The rearing of this traditional pig breed is known as the *montanera*, consisting of outdoor feeding with *Quercus* spp. acorns and regular free-roaming in the dehesas (Gaspar et al. 2008). Dehesas are savannah-like habitats composed by *Quercus* spp. trees and pasture lands lying close to Mediterranean woodlands and scrublands. In these agro-forestry systems, wild ungulates share space, water, and food resources with domestic livestock, and biosecurity measures are less stringent, increasing the probability of pathogen transmission (Gortázar et al. 2005). At the same time, breeding systems have been shifting towards being semi-intensive and intensive, mainly in order to shorten the growing period. This intensification may facilitate the transmission of pathogens into this rustic pig breed.

Different studies have pointed out that the transmission of PRRSV is more likely to occur from domestic pigs to wild boar rather than vice versa (Ruiz-Fons et al. 2008) and that this is even more likely in regions of high pig density (Albina 1997). In fact, seroprevalences up to 90 % have been described in Spain in this kind of farms (Gutiérrez-Martín et al. 2000). Given the ubiquity and high prevalence of PRRSV in domestic pigs and the abundance of wild boar and free-roaming Iberian pigs in the dehesa ecosystem, the aim of this study was to investigate the epidemiological situation of PRRS in both wild boar and Iberian pigs in this typical and special ecosystem in southwestern Castile-La Mancha, which has one of the most important free-roaming porcine livestock and hunting industries in Spain. This knowledge may help to provide information on the role that both types of suids may play in the persistence and circulation of this pathogen.

Material and methods

Domestic pig density and PRRSV status in wild boar

To investigate the potential effect of domestic pig density on the occurrence of PRRSV to wild boar, we used ArcGIS 9.3 software (ESRI, Redlands, CA, USA). First, we identified the sampling locations of PRRSV in wild boar published to date in Europe (Fig. 1a, Table 1) and constructed a point layer. Second, we downloaded a raster map with pig density estimates from the FAO database (http://www.fao.org/geonetwork) (Wint and Robinson 2007). Then, we used the function "Extract values to points" to obtain the interpolated pixel value of each PRRSV sampling location. We approximated the pig density value of each sampling location by bilinear interpolation of the values of all adjacent cells. Finally, we grouped the density values of the locations into two groups, "PRRS-positive" and "PRRS-negative," based on the positive or negative antibody or viral genome findings reported in each study. We did not distinguish RT-PCR (i.e., recent infection, with presence of viral RNA) from enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; i.e., evidence of an old infection) positive results, since this approach is not considering the temporality of the infections, but the circulation of the virus among European wild boar populations. Statistical analyses were performed using R language (v. 2.14.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2011). For each of these groups, we calculated the means and 95 % confidence intervals (CI) of density values and compared them by using boxplots (package "graphics") (Fig. 1b). Statistical differences were assessed by performing the Mann–Whitney nonparametric test (package "stats").

Study area and collection of samples

The study was carried out in the provinces of Toledo (TO) and Ciudad Real (CR) in Castile-La Mancha (CLM) (38°32′45″ N to 39°32′45″ N in latitude; 3°54′34″ W to 4°52′18″ W in longitude) (Fig. 2). This region is flanked by two mountain chains: Montes de Toledo (MT) in the north and Sierra Morena (SM) in the south (Fig. 2). A patchy

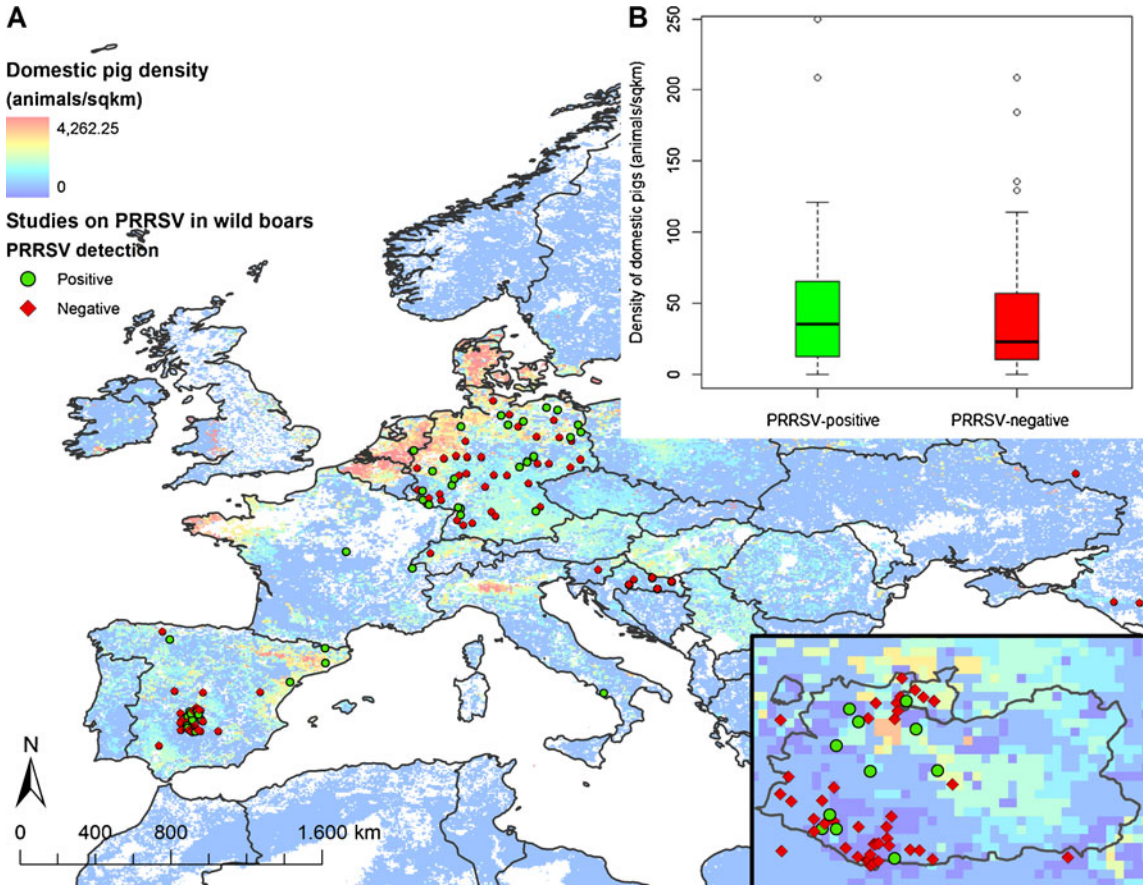


Fig. 1 **a** Spatial distribution of the approximate locations of the sampling sites to detect PRRSV in wild boar, overlaid on a raster map of pig density in Europe. *Green dots* denote "PRRS-positive" sites, where animals tested positive for either antibodies (ELISA) or genome (RT-PCR). *Red diamonds* indicate "PRRS-negative" sampling sites. **b** The graph shows the boxplots of domestic pig density in the two groups of sampling sites. Approximate sampling locations were calculated from Vicente et al. (2002), Zupancic et al. (2002), Kukushkin et al. (2008), Reiner et al. (2009), Boadella and Gortázar (2011), Wu et al. (2011), Hälli et al. (2012), Hammer et al. (2012), Roic et al. (2012), and Rodríguez-Prieto et al. current study

distribution of intensive pig farms (mainly in flat areas) and big game estates (mainly in hilly terrains, i.e., MT and SM) are present throughout the study region. The size of intensive farms varies greatly in the study area, from several sows per farm up to 7,100 individuals (the authors, unpublished). In SM, Iberian pig breeding is common, whereas it is not in MT. Conversely, Iberian pig density is low (i.e., even below 1 animal/ha) (the authors, unpublished).

Hunted wild boar (n=294) were sampled from 2002 to 2010 in 23 public and private hunting estates in CLM. Sampling was biased towards the hunting season, from October to February. Sampling was distributed between MT (n=138) and SM (n=156). Wild boar were necropsied in detail, morphometrically characterized and sexed (Vicente et al. 2006). Age was estimated based on tooth eruption patterns (Sáenz de Buruaga et al. 1991). Blood was collected from hunted animals from the heart or thoracic cavity during field necropsies, and after centrifugation, the sera obtained were frozen at −20 °C for later analysis. Tissue samples from 11 wild boar were also collected: spleen (n=9), tonsils (n=2), and bronchial (n=5), mandibular (n=2), and cephalic lymph nodes (n=9). Four tissue samples from pigs of the Large White breed infected with different PRRSV strains were processed and analyzed in parallel during the whole process as positive controls. Two of these positive controls were strains belonging to EU genotype, while the other two belonged to the US genotype. All tissue samples were stored at −20 °C and were diluted 1:10 in sterile PBS and homogenized before analysis.

Serum samples from Iberian pigs (n=80) were obtained from regional authorities. These samples were collected from 19 farms in SM during the official Aujezsky's disease campaign in late 2009 (RASVE 2010) and stored at −20 °C until analysis.

Serological analysis

Serological analysis to detect the presence of PRRSV antibodies was performed in sera from 294 wild boar and 80

Table 1 Review of studies on detection of PRRSV genome and antibodies in wild boar over Europe

Publication	Country	Year of sampling	Type of test	Positive rate (%)	PRRS status[a]	Coordinates available for this study[b]
Oslage et al. (1994)	Germany	1991–1992	IPMA	0	Neg	No
Albina et al. (2000)	France	1992–1994	ELISA: Albina et al. (1992)	1.3/8.3[c]	Pos	No
Vicente et al. (2002)	Spain	1999–2000	ELISA: INGENASA	0	Neg	Yes
Zupancic et al. (2002)	Croatia	1999	ELISA: HerdChek	0	Neg	Yes
Bonilauri et al. (2006)	Italy	2005	RT-PCR (not specified)	100[d]	Pos	No
Ruiz-Fons et al. (2006)	Spain	2000–2003	ELISA: HerdChek 2XR	0	Neg	No
Vengust et al. (2006)	Slovenia	2003–2004	ELISA: HerdChek	0	Neg	No
Kukushkin et al. (2008)	Russia	2002–2003, 2004–2005	ELISA: self-preparation RT-PCR: nested multiplex	0 0	Neg	Yes
Reiner et al. (2009)	Germany	2004–2007	RT-PCR: nested multiplex	15.9	Both	Yes
Montagnaro et al. (2010)	Italy	2005–2006	ELISA: HerdChek	37.7	Pos	No
Closa-Sebastià et al. (2011)	Spain	2004–2007	ELISA (not specified)	3.0	Pos	No
Stankevicius et al. (2011)	Lithuania	2008–2010 2007–2011	ELISAs: HerdChek 2XR, X3, Ingezim and others RT-PCRs: Stadejek et al. (2006, 2008)	6.5 8.2	Pos	No
Wu et al. (2011)	Switzerland	2008–2010	ELISA: HerdChek X3 RT-PCR: adaptation of Kleiboeker et al. (2005)	0.4 0	Both	Yes
Boadella et al. (2012)	Spain	2000–2011	ELISA: HerdChek 2XR	2.1	Both	Yes
Hälli et al. (2012)	Sweden	2005–2008	ELISA: HerdChek	0	Neg	No
Hammer et al. (2012)	Germany	2008–2009	ELISA: HerdChek 2XR RT-PCRs: Wagner et el. (2010) and adaptation of Revilla-Fernández et al. (2005)	0.5 0	Both	Yes
Roic et al. (2012)	Croatia	2005–2006 2009–2010	ELISA: HerdChek 2XR	9.7 0	Pos Neg	Yes
Rodríguez-Prieto et al. (this study)	Spain	2002–2010	ELISA: HerdChek RT-PCRs: adaptation from Donadeu et al. (1999) and Reiner et al. (2009)	2.0 0	Both	Yes

[a] The "PRRS status" denotes whether the techniques applied to these studies delivered positive ("Pos") or negative ("Neg") results for wild boars. Certain studies were denoted by "Both" when they yielded a positive result in certain study areas and a negative result in others

[b] Coordinates from all the studies marked with "Yes" could be calculated in order to perform the spatial density analysis

[c] Albina et al. (2000) found a PRRS seroprevalence of 1.3 % in free-living wild boar and 8.3 % in farmed wild boar in France

[d] Bonilauri et al. (2006) detected ORF7 in a single juvenile wild boar killed in a traffic accident, and the authors concluded that this was an isolated case

Iberian pigs, using an indirect ELISA (HerdChek® IDEXX, Liebefeld-Bern, Switzerland) that detects antibodies targeted against both EU and US strains. The kit was used according to the manufacturer's instructions. Sensitivity and specificity are as high as 98.8 and 99.9 % for domestic pig samples, respectively, according to the manufacturer's specifications.

Virological analysis

RNA was extracted from all the serum samples (n=374) using the Nucleospin® RNA virus kit and from tissue homogenates (n=27) using the Nucleospin® RNA II kit (both from Macherey-Nagel, Düren, Germany), following the manufacturer's

recommendations. Extraction products were stored at −80 °C until further analysis.

We used two adapted RT-PCR assays, based on the detection of ORF7 (Donadeu et al. 1999) and ORF1 (Reiner et al. 2009), respectively. Although these are the most conserved ORFs, and each of them should be suitable for diagnosis, we screened both since Reiner et al. (2009) could only identify PRRSV genome in wild boar by amplifying ORF1. Details of primers used are displayed in Table 2.

The optimized RT-PCR to detect ORF7 was performed in a final volume of 25 μl containing 2 μl of RNA template, 12.5 μl of SYBR Green Master Mix (Quantitative RT-PCR Brilliant II SYBR Green Master Mix, Stratagene, Palo Alto, CA, USA), 0.0625 μl of StrataScript RT/RNase Block Enzyme Mixture (Stratagene), and 300 nM of each primer. The adapted one-step RT-PCR to amplify ORF1 was the same as the reaction to amplify ORF7, except for the primers. We used 200 nM of EU genotype primers and 300 nM of US genotype ones.

All reactions were performed in a Stratagene MxPro 3000 thermocycler (Stratagene). Thermal cycling in the ORF7 RT-PCR consisted of RT at 48 °C for 30 min, followed by denaturation at 95 °C for 10 min; 40 amplification cycles of 95 °C for 45 s, 60 °C for 90 s; and a final extension at 72 °C for 7 min. Thermal cycling in the ORF1 RT-PCR involved RT at 48 °C for 30 min, followed by denaturation at 95 °C for 10 min; 45 cycles of amplification of 94 °C for 30 s, 58 °C for 90 s and 72 °C for 60 s; and finally 72 °C for 10 min, followed by 95 °C for 2 min. During both RT-PCRs, fluorescence measurements were carried out during the extension step of each cycle. The dissociation curve was generated from 60 to 99 °C in 40 steps of 1 °C every 30 s.

We also studied a housekeeping gene in order to ensure the RNA conservation during the handling of our wild boar samples. We selected the ribosomal protein S20 (RP-S20) gene, since it shows the greatest degree of conservation among different pig breeds (Wang et al. 2011). The RT-PCR procedure published by Wang et al. (2011) was adapted (data not shown) and used to analyze the 27 wild boar tissue homogenates.

Results

We found no significant differences in pig density between PRRS-positive and PRRS-negative wild boars in Europe, as boxes of the boxplots were overlapping (Fig. 1b) and Mann–Whitney test was not significant (p=0.1). However, sampling sites where animals tested positive for PRRS tended to be areas with a higher density of pigs (mean density, 56.188 animals/km^2; 95 % CI, 35.129–77.246) than were sites with PRRS-negative results (mean, 37.027 animals/km^2; 95 % CI, 28.610–45.444).

Of the 374 samples analyzed by ELISA, seven wild boar (2.04 %) and one Iberian pig (1.25 %) tested positive for antibodies against PRRSV. We could not observe any statistical significance for the variables studied (i.e., hunting season, sex, age, region, fenced or not fenced hunting estate).

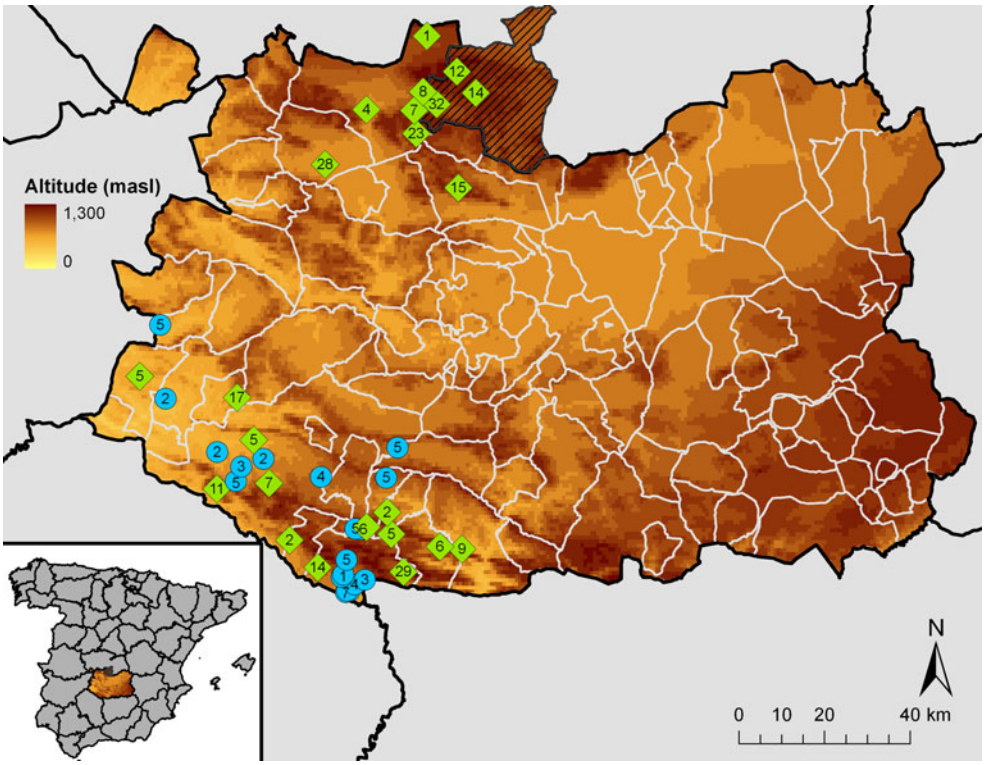


Fig. 2 Location of the PRRSV sampling sites in Castile-La Mancha, Spain. The *figure in the lower left corner* shows the position of the study area in mainland Spain. Most of the samples were collected in two of the highest natural areas of the region: Montes de Toledo, including the northern part of Ciudad Real and the Toledo municipality of Los Yébenes (*gray hatched*); and Sierra Morena, to the south of Ciudad Real. *Green diamonds* denote hunting estates and *blue circles* denote Iberian pig farms. *Numbers inside each figure* indicate the number of sampled wild boar (*diamonds*) and Iberian pigs (*circles*)

Table 2 Primers used in the RT-PCRs to detect PRRSV and the housekeeping gene RP-S20 in wild boar and Iberian pigs

Primer ID	Primer sequence (5′–3′)	PCR product (bp)	Region amplified	PRRSV genotype
ORF1-EU-FW[a]	CTGTATGAACTTGCAGGATG	186	PRRSv—ORF1b	European
ORF1-EU-RS[a]	CGACAATACCATGTGCTG			
ORF1-US-FW[a]	GGCGCAGTGACTAAGAGA	108	PRRSv—ORF1b	North American
ORF1-US-RS[a]	GTAACTGAACACCATATGCTG			
ORF7-P1[b]	CCAGCCAGTCAATCARCTGTG	291–300	PRRSv—ORF7	Common
ORF7-P2[b]	GCGAATCAGGCGCACWGTATG			
RP-S20 FWD[c]	CGCTCCTGGCTCACCGCTGTT	148	RP-S20	
RP-S20 RVS[c]	TGCGGCTGGTGAGGGTGATCC			

[a] From Reiner et al. (2009)

[b] From Donadeu et al. (1999)

[c] From Wang et al. (2011)

All the 27 tissue homogenates tested positive for the RP-S20 amplification, showing a good conservation of the sample RNA. As for PRRSV, none of the wild boar or Iberian pig samples was positive in both RT-PCRs. Interestingly, we observed amplification of a nonspecific product in many samples when performing the ORF1 RT-PCR at the primer annealing temperature of 55 °C reported by the original authors of the method (Reiner et al. 2009). Further testing showed that this product was amplified only when the reverse primers of both genotypes were combined. Increasing the annealing temperature to 58 °C eliminated this nonspecific product.

Discussion

PRRS is present around the world and endemic in many countries, despite widespread application of eradication measures. The virus tends to be highly prevalent on intensive pig farms. However, the precise role that wild boar populations play in PRRS epidemiology in the wild and the interface with domestic livestock remains unclear.

Our geo-spatial analysis shows a slight tendency to find PRRS-positive wild boar in areas with a higher density of domestic swine, but without statistical significance (Fig. 1b). The absence of statistical relationships between PRRS occurrence and density of domestic pigs in Europe suggests that wild boar may maintain PRRSV infection in the wild at low rates. Then, PRRSV circulation in wild boar may be influenced not only by pig density but also by the PRRS prevalence in domestic pigs and other still unknown factors, such as the biosecurity of domestic pig husbandry. Unfortunately, we could not indicate the prevalence in intensive pig farms in our study area because PRRS surveys are not mandatory in Spanish pig farms. Nonetheless, it is known that PRRSV in Spain circulates in most of the intensive pig herds, reaching high prevalences (Gutiérrez-Martín et al. 2000).

In this study, only 7 of 294 wild boar (2.04 %) were found to be seropositive for PRRS. This result is consistent with other studies carried out all over the world, in which PRRSV was found to have low prevalence among wild boar populations (Table 1). The seroprevalence reported here in wild boar is also similar to the results obtained all over Spain (2.1 %) (Boadella et al. 2012), in Catalonia, in north-eastern Spain (3.0 %) (Closa-Sebastià et al. 2011), or even in our study area (2.82 %) (Boadella et al. 2012). Other studies have failed to detect PRRSV antibodies at all (Table 1). Only 1 out of the 80 open-air farmed Iberian pigs tested (1.25 %) was positive for PRRSV antibodies. To the best of our knowledge, this is the first report of PRRSV status on Iberian pig farms.

In none of the sera analyzed in the present study, PRRS viral RNA could be detected by both RT-PCR assays. This lack of finding PRRSV in wild boar samples has occurred in other studies (Table 1). In contrast, some studies in the literature reported the finding of unexpected PRRSV strains in the wild. Bonilauri et al. (2006) described a new PRRSV sequence which could not be related to other domestic pig strains. In Germany, Reiner et al. (2009) found that most of the wild boar PRRSV-positive samples (i.e., 93.7 %) belonged to the US genotype, but were unrelated to vaccine strains. Stankevicius et al. (2011) obtained 13 positive samples which corresponded to subtypes 3 and 4, traditionally present in domestic pigs in Belarus and Latvia but not in Lithuania. These findings point out the circulation of wild-type PRRSV strains in wild boar, differing from those circulating in intensive pig farms.

This study was conducted using the best diagnostic techniques available, given the lack of assays adapted to wildlife. Access and quality of samples are major challenges when investigating infectious diseases in wild animals. These samples are often collected and handled under less

than ideal circumstances, so good laboratory practice is essential for obtaining reliable results (Boadella and Gortázar 2011). Positive ELISA results may be due to lack of specificity, but samples in this study were analyzed by a well-established commercial ELISA kit widely used for PRRSV prevalence studies in wild boar populations (see Table 1), and our positive results were confirmed by repeating the test. As for the RT-PCR results, false negative results cannot be excluded (Truyen et al. 2006) and could be minimized by applying standardized commercial kits. However, our adapted assays were targeting the two most conserved genes of PRRSV, ORF1 and ORF7, and also verified the integrity of nucleic acids in tissue samples by amplifying the housekeeping gene RP-S20 as an internal control, showing that nucleic acids in the samples were of good quality. Samples were targeted to harbor PRRSV if there was an active virus circulation, since experimental studies in domestic pigs have shown that virus lasts up to 30 days post-infection (dpi) in blood (though it can be detected up to 250 dpi) and up to 165 dpi in tonsils or lymph nodes (Zimmerman et al. 2012). Taken all these facts together, our approach was considered good enough to detect PRRSV in case it was present in wild boar populations. More sampling size would be needed in order to confirm our observations and to evaluate the time trend of the infection spread among wild boar populations in our study area.

The risk of pathogen transmission between wild boar and open-air raised pigs is well documented for *Brucella suis*, Aujezsky's disease or classical and African swine fever (Laddomada et al. 1994; Fritzemeier et al. 2000; Hars and Rossi 2005; Köppel et al. 2007; Beltrán-Alcrudo et al. 2008; Wu et al. 2011; Wu et al. 2012). Most studies found a very low PRRSV prevalence in wild boar, probably because the infection remains confined to individual animals and its spread seems quite limited. Similarly, Iberian pigs show a very low infection rate, unlike the white pig breeds reared on intensive farms. The biosafety measures in these farms are usually less stringent, which makes Iberian pigs the animals most likely to contact and infect wild boar. However, animal densities in these farms (even on semi-intensive ones) are lower than on white breed intensive farms, so direct contact is not so frequent, leading to lower PRRSV prevalences. This reduces the probability of virus transmission to wild swine in this wildlife–domestic livestock interface.

This study suggests once again that direct contact is the most effective way of PRRSV transmission. Besides strong indications for density-dependent transmission of PRRSV, other factors should be considered in trying to understand the contrast between PRRSV prevalence in intensively kept white pigs on the one hand and free-roaming wild boar and Iberian pigs at the other hand. It seems likely that infections by local strains of virus (i.e., those typically circulating in domestic pigs in the region) are not so common in wild boar. A potential explanation could be the ancestor of PRRSV. Plaguemann (2003) hypothesized that PRRSV may have its origin in wild boar infected by a mutant of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV), a closely related *Arterivirus* of mice. This mutant may have been in contact with wild boar populations in Europe since the early twentieth century. Then, it is plausible that wild boar developed natural resistance to common strains of PRRSV. This resistance could explain why PRRSV sequences found in wild boar in Italy (Bonilauri et al. 2006), Germany (Reiner et al. 2009), or Lithuania (Stankevicius et al. 2011) are related to uncommon PRRSV strains rather than ones commonly found in domestic pigs. Further investigations are needed in order to determine whether wild boar have natural protection to PRRSV infection, since it may explain why we did not detect the PRRSV genome in the present study.

In conclusion, our results confirm those of other studies that wild boar do not seem to play an important role in the epidemiology of PRRSV in the area studied. Further investigations for PRRSV at the wildlife–domestic livestock interface have to focus on maximizing the chances to detect viral RNA (choice of samples, validation of RT-PCR tests used) in order to verify by sequencing the possible circulation of independent, LDV-related strains in the wild. Long-term studies could also evaluate in detail the potential effects of intensive management, such as artificial feeding and the resulting unnaturally high population densities.

Acknowledgments This work could not have been performed without the personal, scientific, and technical support of Rocío Sánchez and Belén Rivera. The study was funded by the research project FAU2008-00004-C03 (INIA) and PEII-0262-7673 (JCCM). Víctor Rodríguez-Prieto holds an FPU pre-doctoral scholarship and Beatriz Martínez-López holds a Juan de la Cierva post-doctoral contract, both funded by the Spanish Ministry of Education and Science. We thank the Agriculture Department of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) and its Delegation in Ciudad Real for providing samples from sanitary campaigns. We acknowledge one anonymous referee for the valuable revision done to the manuscript.

Conflict of interest The authors of this study had no financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias their work.

References

Acevedo P, Escudero MA, Muñoz R, Gortazar C (2006) Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain. Acta Theriol 51:327–336

Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran J, Vannier P (1992) An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Ann Rech Vet 23:167–176

Albina E (1997) Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. Vet Microbiol 55:309–316

Albina E, Mesplède A, Chenut G, Le Potier MF, Bourbao G, Le Gal S, Leforban Y (2000) A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boar from 1991 to 1998. Vet Microbiol 77:43–57

Beltrán-Alcrudo D, Lubroth J, Depner K, De La Rocque S (2008) African swine fever in the Caucasus. EMPRES Watch. http://www.fao.org/docs/eims/upload/242232/EW_caucasus_apr08.pdf. Accessed 25 Jun 2012.

Boadella M, Gortázar C (2011) Effect of haemolysis and repeated freeze–thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA. BMC Res Notes 4:498

Boadella M, Ruiz-Fons JF, Vicente J, Martín M, Segalés J, Gortazar C (2012) Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. Transbound Emerg Dis 59:395–404

Bonilauri P, Merialdi G, Dottori M, Barbieri I (2006) Presence of PRRSV in wild boar in Italy. Vet Rec 158:107–108

Cho JG, Dee SA (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenol 66:655–662

Closa-Sebastià F, Casas-Díaz E, Cuenca R, Lavín S, Mentaberre G, Marco I (2011) Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). Eur J Wildl Res 57:977–981

Donadeu M, Arias M, Aguero M, Gomez-Tejedor C, Aguero M, Romero LJ, Christianson W, Sanchez-Vizcaino JM (1999) Using PCR to obtain PRRSV-free piglets from endemically infected herds. Swine Health Prod 7:255–261

Fritzemeier J, Teuffert J, Greiser-Wilke I, Staubach C, Schlüter H, Moennig V (2000) Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. Vet Microbiol 77:29–41

Gaspar P, Escribano M, Mesías FJ, Rodríguez de Ledesma A, Pulido F (2008) Sheepfarms in the Spanish rangelands (*dehesas*): typologies according to livestock management and economic indicators. Small Ruminant Res 74:52–63

Gortázar C, Vicente J, Samper S, Garrido JM, Fernández-de-Mera IG, Gavín P, Juste RA, Martín C, Acevedo P, de La Puente M, Höfle U (2005) Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. Vet Res 36:43–52

Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Delgado O, Álvarez-Nistal D, De La Puente-Redondo VA, García-Rioja F, Martín-Vicente J, Rodríguez Ferri EF (2000) Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. Res Vet Sci 68:9–13

Hälli O, Ala-Kurikka E, Nokireki T, Skrzypczak T, Raunio-Saarnisto M, Oeltoniemi OAT, Heinonen M (2012) Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. Vet J 194(1):98–101. doi:10.1016/j.tvjl.2012.03.008

Hammer R, Ritzmann M, Palzer A, Lang C, Hammer B, Pesch S, Ladinig A (2012) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Germany. J Wildl Dis 48:87–94

Hars J, Rossi S (2005) Actualites dans le domaine de la surveillance des maladies transmissibles en France (peste porcine classique, maladie d'Aujeszky, tuberculose, brucellose, leptospirose, trichinellose, influenza aviaire, virus West Nile). Proceedings of the 23èmes Recontres du GEEFSM, La Cortinada, Andorre

Kleiboeker S, Schommer S, Lee S, Watkins S, Chittick W, Polson D (2005) Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. J Vet Diagn Invest 17:165–170

Köppel C, Knopf L, Ryser M-P, Miserez R, Thür B, Stärk KDC (2007) Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. Eur J Wildl Res 53:212–220

Kukushkin S, Kanshina A, Timina A, Baybikov T, Mikhalishin V (2008) Investigation of wild boar (*Sus scrofa*) for porcine reproductive and respiratory syndrome in some territories of Russia. Eur J Wildl Res 54:515–518

Laddomada A, Patta C, Oggiano A, Caccia A, Ruiu A, Cossu P, Firinu A (1994) Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: a serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. Vet Rec 134:183–187

Lunney JK, Benfield DA, Rowland RRR (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. Virus Res 154:1–6

Montagnaro S, Sasso S, De Martino L, Longo M, Iovane V, Ghiurmino G, Pisanelli G, Nava D, Baldi L, Pagnini U (2010) Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. J Wildl Dis 46:316–319

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73:270–280

Oslage U, Dahle J, Müller T, Kramer M, Beier D, Liess B (1994) Prävalenz von Antikörpern gegen die Viren der Europäischen Schweinepest, der Aujeszkyschen Krankheit und des <<Porcine reproductive and respiratory syndrome>> (PRRS) bei Wildschweinen in den Bundesländern Sachsen-Anhalt und Brandenburg. Dtsch Tierärztl Wschr 101:33–38

Plaguemann PGW (2003) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. Emerg Inf Dis 9:903–908

Red de Alerta Sanitaria Veterinaria (RASVE) (2010) Programa Nacional de Erradicación de Aujezsky. Año 2010. http://rasve.mapa.es/publica/programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5C2010%5CENFERMEDAD%20DE%20AUJESZKY%5CPROGRAMA%20NACIONAL%20DE%20ERRADICACION%20DE%20AUJESZKY.%20A%C3%91O%202010.PDF. Accessed 26 Apr 2012.

Reiner G, Fresen C, Bronnert S, Willems H (2009) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars. Vet Microbiol 136:250–258

Revilla-Fernandez S, Wallner B, Truschner K, Benczak A, Brem G, Schmoll F, Mueller M, Steinborn R (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. J Virol Methods 126:21–30

Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T (2012) Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005–06 and 2009–10. J Wildl Dis 48:131–137

Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, Hofle U, Villanua D, Gauss C, Segales J, Almeria S, Montoro V, Gortazar C (2006) Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. Theriogenol 65:731–743

Ruiz-Fons F, Segalés J, Gortázar C (2008) A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. Vet J 176:158–169

Sáenz de Buruaga M, Lucio AJ, Purroy FJ (1991) Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas. Edilesa, Vitoria-Gasteiz

Shi M, Lam TT, Hon CC, Hui RK, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC (2010) Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. Virus Res 154:7–17

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgórska K (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. J Gen Virol 87:1835–1841

Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, Timina AM, Krabbe JS, Chabros K, Potapchuk D (2008) Definition of subtypes in the

European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. Arch Virol 153:1479–1488

Stankevicius A, Buitkuviene J, Valanciute J, Cepulis R, Stadejek T (2011) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Lithuanian wild boar (*Sus scrofa*) population. Proceedings of the EuroPRRS2011, Novi Sad, Serbia, pp 54–59

Truyen US, Wilhelm S, Genzow M, Schagemann G (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): a ring test performed in Germany to assess RT-PCR detection methods. J Vet Med B 53:68–74

Vengust G, Valencak Z, Bidovec A (2006) A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. J Vet Med Series B 53:24–27

Vicente J, León-Vizcaino L, Gortázar C, Cubero MJ, González M, Martín-Atance P (2002) Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boar from south-central Spain. J Wildl Dis 38:649–652

Vicente J, Segalés J, Höfle U, Balasch M, Plana-Duran JC, Domingo M, Gortazar C (2004) Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet Res 35:243–253

Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernandez-de-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C (2006) Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. Vet Res 37:107–119

Wagner J, Kneucker A, Liebler-Tenorio E, Fachinger V, Glaser M, Pesch S, Murtaugh MP, Reinhold P (2010) Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet J 18:310–319

Wang S, Li J, Zhang A, Liu M, Zhang H (2011) Selection of reference genes for studies of porcine endometrial gene expression on gestational day 12. Biochem Biophys Res Commun 408:265–268

Wint GRW, Robinson TP (2007) Gridded livestock of the world 2007. FAO, Rome, p 131

Wu N, Abril C, Hinić V, Brodard I, Thür B, Fattebert J, Hüssy D, Ryser-Degiorgis M-P (2011) Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in Switzerland? J Wildl Dis 47:868–879

Wu N, Abril C, Thomann A, Grosclaude E, Doherr MG, Boujon P, Ryser-Degiorgis M-P (2012) Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential *Brucella suis* spill-over. BMC Vet Res 8:116

Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M (2012) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine Arterivirus). In: Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (eds) Diseases of swine, 10th edn. Blackwell, Ames, pp 461–486

Zupancic Z, Jukic B, Lojkic M, Cac Z, Jemersic L, Staresina V (2002) Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49:253–256

Molecular evidence of shared BVD epidemiology between red deer and extensive cattle in South Central Spain

Víctor Rodríguez-Prieto[1*], Deborah Kukielka[1], Belén Rivera-Arroyo[1], Beatriz Martínez-López[1,2], Ana Isabel de las Heras[1], José Manuel Sánchez-Vizcaíno[1], Joaquín Vicente[2]

[1] VISAVET, Veterinary School, Complutense University of Madrid. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.
[2] IREC Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCLM), Ronda de Toledo s/n, 13071 Ciudad Real, Spain.

* Corresponding author at: VISAVET, Veterinary School, Complutense University of Madrid. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel. +34.91.394.37.02; fax: +34.91.394.39.08. Email address: victor@sanidadanimal.info

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a pestivirus affecting cattle production worldwide. Other ungulates such as cervids (and even wild boar, *Sus scrofa*) can be infected by the virus. We assessed the shared epidemiology of BVDV in South Central Spain (SCS), for which we sampled hunted red deer (*Cervus elaphus*; n=267) and wild boar (n=52) from 19 populations, so as sera from 18 cattle farms in proximity. We used ELISA kits for serological screening, Taqman RT-PCR assay for virus determination, and subsequent phylogenetic analysis for 17 RT-PCR positive samples. Fifty-two red deer (19.47%) and 82 cattle (48.24%) samples tested positive. A high apparent prevalence (39.70%) was obtained for red deer, while only five cattle serum pools tested positive by RT-PCR. Conversely, no wild boar tested positive to ELISA or RT-PCR. Twenty one red deer (7.87%) tested positive to both ELISA and RT-PCR, which may be sampled during viremia or may represent persistently infected individuals. All 17 sequences were included within the BVDV subgroup 1b, though nine of these (4 red deer and 5 cattle pools) formed a separate branch. This suggests that there might be a common strain infecting both cattle and red deer. The risk for extensive cattle to test positive against BVDV is statistically associated to increased red deer abundance. Our findings suggest a shared epidemiology of BVDV mediated by contact at the wildlife-cattle interface, with potential to be used as a marker for surveillance at these shared habitats. Further research is needed to elucidate the role of red deer as reservoir of BVDV.

Keywords: bovine viral diarrhea; Pestivirus; Taqman RT-PCR; ELISA; wildlife reservoirs; Spain

1. Introduction

Pestivirus is a genus of RNA viruses belonging to the family *Flaviviridae* that comprises four major members: bovine viral diarrhoea virus (BVDV) genotypes 1 and 2, border disease virus (BDV) and classical swine fever virus (CSFV) (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994). Pestiviruses are characterized for affecting a wide variety of ungulates. Specifically, BVDV mainly affects cattle causing a significant economic impact on livestock production. This disease is considered endemic in many European regions,

reaching values up to 60-85% in the antibody detection rate (Houe, 1999).

Many European countries have implemented eradication campaigns, which are mainly focused on removing persistently infected (PI) calves. Although the percentage of PI animals tends to be in a low range of 0.5-2% in cattle populations (Houe, 1999) this proportion is enough to perpetuate BVDV circulation over time, due to the high viral excretion occurring in these individuals. However, other ways of transmission have been recently recognized, including the contact of cattle with infected wild hosts (Van Campen et al., 2008).

In fact, the transmission of pathogens between wild and domestic hosts is becoming an issue of great interest all over the world (Gortázar et al., 2007). Many current research programs are trying to evaluate the role of wild hosts in the persistence and transmission of diseases shared with domestic animals. As more information is gained, more species are designated as reservoirs of infectious diseases, widening the classical host ranges. For instance, despite pestiviruses were firstly designated according to their domestic host origin, a high cross-reactivity and an extensive interspecies transmission have been recently demonstrated (Giangaspero and Harasawa, 2011). In the case of BVD, serological surveys in free-ranging and captive populations demonstrated BVDV infection in more than 40 species (Van Campen et al., 2008). This list entails a wide variety of ruminants, especially cervids, though other species such as wild boar (*Sus scrofa*) or rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are potential carriers of BVDV (Wizigmann, 1984). In fact, vertical transmission in female pregnant deer and subsequent delivery of PI fawns has been experimentally proven in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). In these experiments, BVDV infections of the pregnant deer successfully occurred by direct inoculation (Passler et al., 2007), or via the contact with PI calves (Passler et al., 2009) or PI fawns (Passler et al., 2010). Despite the light shed on these aspects, the role that these species play in the epidemiology of the disease remains unclear.

The interaction between domestic livestock and wild animals is suggested as a potential source for BVDV infection (Frölich et al., 2012), which may compromise the potential eradication in domestic populations. This contact may be direct or indirect via common pasturing and shared watering areas (Richomme et al., 2006). Conversely, contact with livestock is not always necessary for infection of wild hosts. For instance, Frölich (1995) showed that free-ranging deer can become infected and maintain the virus without contact with cattle. Elazhary et al. (1981) also observed a high seroprevalence in free-ranging Canadian caribou (*Rangifer tarandus*) without contact with domestic cattle for 25 years. These findings suggest that BVDV could be maintained in wild populations without the influence of transmission from cattle. BVDV spread can be even enhanced when animal densities are high, so any management measure leading to high wild ruminant densities and/or aggregation may favor virus circulation within a population. These management practices, especially when oriented to increase the hunting bags, include fencing, supplementation of feeding and watering or translocation of animals (Gortázar et al., 2006; Martin et al., 2011). When not properly controlled, human-derived management leads not only to the overabundance of wild species, but also to create an optimal epidemiological scenario for the transmission of viruses.

In Europe, wild boar and deer constitute the major big game species. For accomplishing the recreational hunting demand, these species are frequently bred under more intensive conditions, but with limited sanitary care (Gortázar et al., 2007). In addition, hunting estates are usually sharing space with extensively reared livestock. In these agroforestry systems wild ungulates can easily interact with extensive livestock, leading to the transmission of pathogens from domestic to wild populations or vice versa. A better understanding of the BVD epidemiology together with molecular characterization of the virus between wild and domestic hosts would allow to identify high-risk areas and enhance the ability to control disease transmission. The aims of this study were to describe (i) viral presence and the molecular patterns of BVDV circulating in extensive cattle and red deer cohabiting, (ii) assessing the epidemiological role of wild ungulates and cattle living in proximity as concerns BVD, as well as (iii) evaluating the potential use of this pathogen as a sanitary marker for the interactions between wildlife (i.e. red deer and wild boar) and domestic cattle. This understanding is key to develop future research on the interactions at the wildlife-cattle interface and to design appropriate husbandry and sanitary policies to more cost-effectively control disease.

2. Material and methods

Study area and animal sampling

The study was carried out in the provinces of Toledo (TO) and Ciudad Real (CR) in the Castile-La Mancha region (CLM) (38º 32’ 45’’ N to 39º 32’ 45’’ N in latitude; 3º 54’ 34’’ W to 4º 52’ 18’’ W in longitude) in South Central Spain (Figure 1).

The study area is flanked by two mountain chains: Montes de Toledo (MT), located between TO and northern CR; and Sierra Morena (SM), in the southern part of CR (Figure 1), which comprises interspersed hunting estates and farms.

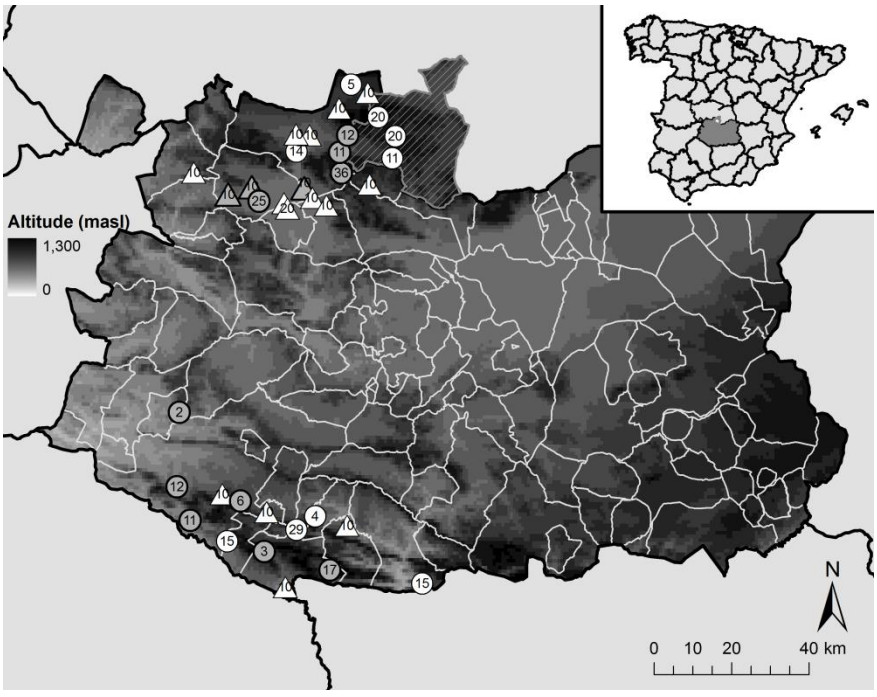


Figure 1. Location of the sampling sites of the study in Castile-La Mancha. Most of the samples were collected in two of the highest areas of the region: Montes de Toledo, entailing the northern part of Ciudad Real and the Toledo municipality of Los Yébenes (grey hatched), and Sierra Morena in the South of Ciudad Real. Circles denote hunting estates, and triangles denote cattle farms. Numbers inside each figure indicate the number of red deer and cattle per hunting estate or farm, respectively. Figures in white indicate lack of closing fences, while figures in grey and outlined in black denote fenced sites. In detail (upper right corner), location of the study area in the southern central region of Spain.

Hunted red deer (n=267) and wild boar (n=52) were sampled from 2003 to 2010 in 19 hunting estates from CLM. Hunting is considered an adequate method for the survey of wild ungulate populations if animals are shot randomly during hunting drives, as it has been done for this study. Hunting took place from October to February. Hunting estates were distributed between MT (n=9) and SM (n=10). Red deer and wild boar were necropsied in detail and sex was recorded (except for 1 red deer and 3 wild boar). Based on tooth eruption patterns (Sáenz de Buruaga et al., 1991), wild boar younger than 6 months were classified as piglets (n=1), those between 7 and 12 months were classified as weaners (n=11), those between 12 and 24 months as juveniles (n=15), and those over 2 years old as adults (n=22). Regarding red deer, individuals less than one year old were classified as fawns (n=6), those between 1 and 2 years were classified as yearlings (n=13), those between 2 and 3 years old as sub-adults (n=26), and those over 3 years old as adults (n=222). Blood samples were taken from the heart or thoracic cavity during field necropsies, and sera obtained were stored at −20°C for further analysis. In several red deer, tissue samples were also included, i.e. spleen (n=6) and retropharyngeal lymph nodes (n=10), and conserved at -20ºC until the homogenization in sterile PBS in a 1:10 proportion.

Serum samples from extensive cattle farms (n=18) were obtained thanks to the sanitary campaigns for bovine tuberculosis. Ten samples from each farm were obtained and conserved at -20ºC until analysis. Due to insufficient volume of sera, samples from each farm were pooled for the virological study.

Serological approach

Serological analyses to detect the presence of antibodies against BVDV were performed in all animals, including red deer (n=267), wild boar (n=52) and cattle (n=180), using an indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (IDEXX, Liebefeld-Bern, Switzerland). This kit detects antibodies targeted against BVDV-1 and -2 strains. In order to clarify doubtful results (n=7 cattle and 33 red deer) and confirmed positive samples (n=82 cattle and 50 red deer), we also performed a blocking ELISA (INGENASA, Madrid, Spain) based on the detection of specific antibodies against the p80 antigen of the BVDV. Both kits were used according to the manufacturers' instructions. Sensitivity and specificity reach values of 96.3/99.5% and 95/92%, respectively (according to manufacturers' data).

Virological approach

Prior to the virus analyses, BVDV was extracted using Macherey-Nagel (Düren, Germany) RNA extraction kits, namely Nucleospin® RNA virus kit for serum samples and Nucleospin® RNA II kit for homogenates from tissue samples. We followed the manufacturer's recommendations to perform the extractions. Extraction products were stored at -20ºC until further analyses.

A one-step real-time retrotranscriptase-polymerase chain reaction (rt RT-PCR) was developed by the adaptation of the RT-PCR described by Baxi et al. (2006). Our rt RT-PCR was based on the amplification of a 68 bp product from pestivirus-common sequence [i.e. 5' untraslated region (UTR)] and further detection of SYBR Green. This technique was used for a preliminary screening of samples; those samples in which amplification was detected

Table 1. Nucleotide sequence and position of primers and probe for BVDV (source: Baxi et al., 2006)

ID	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Amplicon size (bp)	Region amplified	Target viruses
Pesti-FW	5'-CTAGCCATGCCCTTAGTAG-3'	19	106	5'-UTR	Common for Pestivirus
Pesti-RS	5'-CGTCGAACCAGTGACGACT-3'	19			
FAM-BVDV1	5'-FAM-TAGCAACAGTGGTGA GTTCGTTGGATGGCT-BHQ-3'	30			BVDV-1

were confirmed to be BVDV1-positive by a Taqman-based RT-PCR assay (Baxi et al., 2006). This assay showed a complete correlation with virus isolation. We decided to test for BVDV1, since it represents the 90% of the isolates from Europe (Frölich et al., 2012). All reactions were performed in a Stratagene MxPro 3000 thermocycler (Stratagene, Palo Alto, CA, USA). Details for primers and the probe are displayed in Table 1.

Once optimal conditions were selected, the final reaction of the rt RT-PCR was performed in 25 µl: 2 µl of RNA template, 12.5 µl of SYBR Green Master mix (Quantitative RT-PCR Brilliant II SYBR Green Master Mix), 0.0625 µl of StrataScript RT/RNase Block Enzyme Mixture (both from Stratagene, Palo Alto, CA, USA) and 400 nM of each primer. As for the Taqman RT-PCR, the final reaction consisted of 20 µl: 2 µl of RNA template, 10 µl of Kapa Probe Fast PCR Master Mix, RT Kapa SYBR Fast One-Step qRT-PCR (both from Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA), 200 nM of each primer and the BVDV1-specific probe.

Thermal profile used for the rt RT-PCR consisted of 30 min at 48ºC for the RT followed by 10 min at 95°C for denaturalization, 40 amplification cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 60 s, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 7 min. The fluorescence reading was performed on the extension step of each cycle. The dissociation curve was generated, starting at 65°C and increasing to 99°C (35 cycles with 1°C increments every 30 s). As for the Taqman RT-PCR, after a period of 15 min at 42ºC for RT and 5 min at 95ºC for denaturalization, amplification was carried out in 40 cycles of 95ºC for 3 s and 60ºC for 30 s.

Regarding the controls, we used two bovine field-isolated strains belonging to the BVDV1b as positive controls, and sera from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) as negative controls. These controls were included from the RNA extraction until the RT-PCR, in order to discard potential problems of contamination. In addition, no-template controls were included in every step, in between the samples and the controls, to monitor the good management during the performance of the techniques. When analyzing the RT-PCRs, the controls were checked before accepting the results from the assays.

Seventeen Taqman RT-PCR products were confirmed by electrophoresis, using 10 µl of the RT-PCR reaction in a 3% agarose gel (with an expected amplicon size of 106 bp), and subsequently sequenced.

Phylogenetic analysis

Sequences for these 17 positive samples from the Taqman assay were included for this purpose. Twelve of these were obtained from red deer, and the resting seven from cattle. Since these amplicons were not long enough to create a solid phylogenetic tree, we additionally sequenced 18 positive samples from red deer by using a nested RT-PCR published by Zhong et al. (2010). This assay produced an amplicon of 195 bp (i.e. 159 bp excluding the primers) from the same region as the Taqman assay (i.e. 5' UTR).

Both types of sequences were aligned with DNA sequences of samples from the GenBank database using Clustal X, version 1.83. Several pestivirus reference and field sequences for BVDV1 (subgroups a, b, and e), BVDV2, CSFV and BDV were used in the alignment files (Hurtado et al., 2003). Phylogenetic analyses were performed using the Kimura model of nucleotide substitution, and the phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method using MEGA5 software (Tamura et al., 2007). The statistical significance of the tree topology was evaluated by bootstrap re-sampling of the sequences 1000 times. The cutoff value was 50%. The results and sequences are shown in Figure 2.

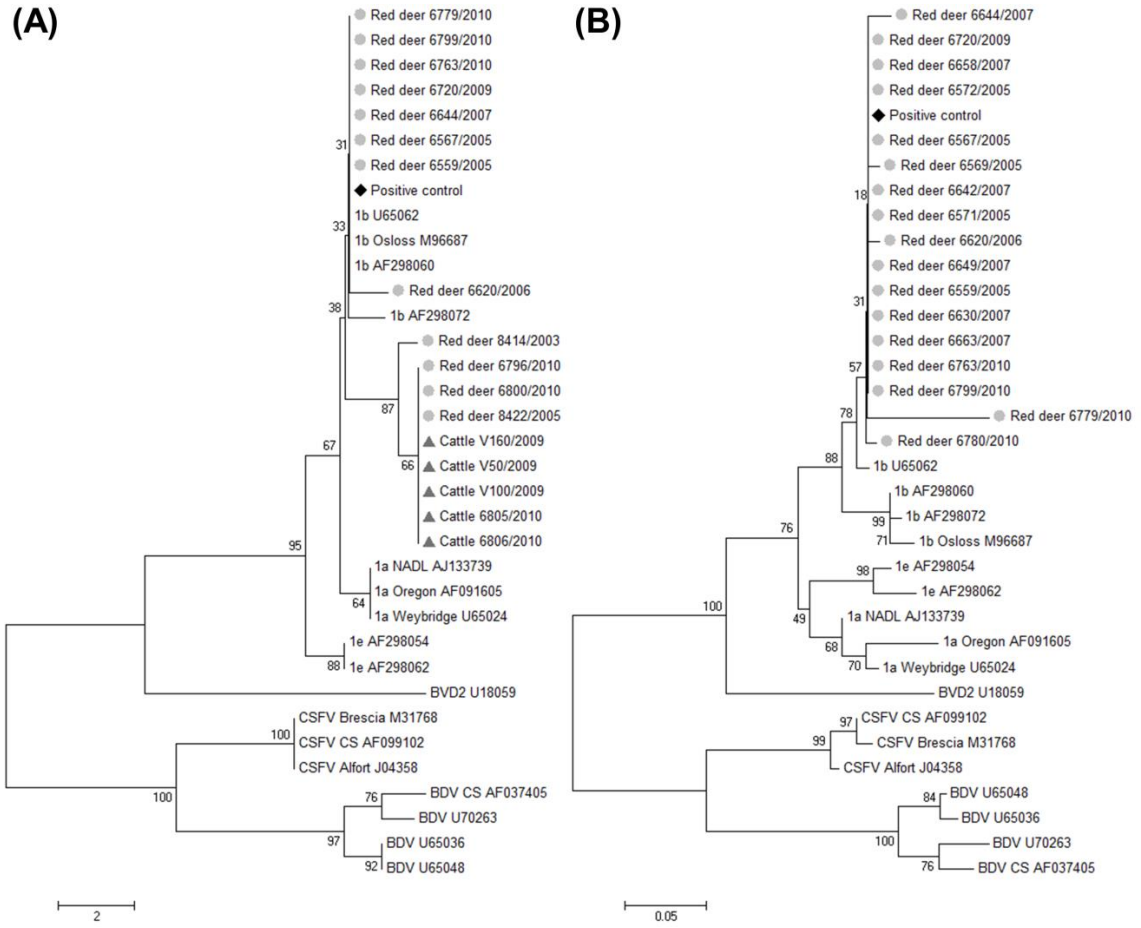


Figure 2. Phylogenetic trees based on the 5'-UTR sequences from red deer and cattle samples of the present study and Pestivirus reference sequences (Hurtado et al., 2003). (A) Consideration of the sequences from the Taqman RT-PCR. (B) Consideration of the sequences from the nested RT-PCR described by Zhong et al. (2010). The trees were constructed by the neighbour-joining algorithm (Tamura et al., 2007). Bootstrap percentage values were calculated from 1000 resamplings and values over 50% are displayed. A black diamond denotes the place for the bovine field sample used as a positive control, while the grey circles indicate red deer samples, and the grey triangles samples from cattle.

Statistical analysis

For each farm, we collected data about location (i.e. x and y coordinate of the farm centroid) and abundance of wildlife species in nearby hunting estates (i.e. within a radius of 2 km). This radius was chosen based on the spatial pattern of presence of red deer in extensive farms of the study area (the authors, unpublished). We calculated an index of relative abundance for red deer per study farm. For that purpose, we used the overall annual hunting bag from the nearby hunting estates during the study period, and this was expressed as deer hunted per year and km^2. We used a GIS layer including the perimeters of all hunting estates, which is the smallest management unit. Data from hunting estates were processed with ArcGIS 9.2 (ESRI, Redlands, CA, USA).

We studied the relationship between the individual risk of cattle to test positive against BVDV by ELISA (as a binomial response variable) and red deer abundance nearby the farm (as explanatory variable) by means of a generalized linear mixed model (GLMM). Farm and sampling season were included as random factors. Concerning red deer, similar models were built for ELISA and RT-PCR tests, respectively. Factors included sex, age, deer abundance index and density of livestock in the estate. We used hunting estate as a random factor. We used a binomial error and a logit link for all the models. SPSS Statistics version 19 (Surrey, UK) was used to fit models. All reported p-values were two-sided and p-values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

There was complete concordance regarding the positive results between the indirect and the blocking ELISAs. As for the doubtful samples of the indirect test (n=40), 2 out of the 33 from red deer were positive and 19 remained doubtful when re-tested by the blocking ELISA. The rest of red deer and all the cattle doubtful samples were negative when retested.

Table 2. Results from the diagnostic tests for BVDV conducted in red deer. ND: not determined

Variable	Category	Number of samples	Number of PCR-positive (%)	Number of ELISA-positive (%)
Species	Red deer	267	106 (39.70)	52 (19.47)
Region	MT	154	68 (44.16)	27 (17.53)
	SM	113	38 (33.63)	25 (22.12)
Fenced estate	Yes	204	82 (40.19)	40 (19.61)
	No	63	24 (38.10)	12 (19.05)
Hunting season	2003-04	17	8 (47.06)	9 (52.94)
	2004-05	20	4 (20.00)	8 (40.00)
	2005-06	36	2 (5.56)	4 (11.11)
	2006-07	29	10 (34.48)	6 (20.69)
	2007-08	46	10 (21.74)	10 (21.74)
	2008-09	30	5 (16.67)	3 (10.00)
	2009-10	89	67 (75.28)	12 (13.48)
Age	Fawn	6	1 (16.67)	1 (16.67)
	Yearling	13	4 (30.77)	1 (7.69)
	Sub-adult	26	7 (26.92)	9 (34.62)
	Adult	222	94 (42.34)	41 (18.47)
Sex	Male	133	58 (43.61)	28 (21.05)
	Female	130	46 (35.38)	23 (17.69)
	(ND)	4	2 (50.00)	1 (25.00)
PCR	Negative	161	----	31 (19.25)
	Positive	106	----	21 (19.81)
ELISA	Negative	196	79 (40.31)	----
	Doubtful	19	6 (31.58)	----
	Positive	52	21 (40.38)	----

Therefore, a total of 52 out of the 267 red deer (19.47%; 95% CI=14.72-24.22) showed antibodies against BVDV (Table 2). Eighty-two out of the 180 cattle samples (45.56%; 95% CI=38.28-52.84) were positive to ELISA. However, none of the wild boar tested positive to the antibody detection. Seroprevalence among regions, fenced or not fenced estates, hunting seasons, age, sex, and PCR results are displayed in Table 2.

Samples were analyzed by the rt RT-PCR adapted from the one described by Baxi et al. (2006). The amplicons were identified as BVDV by this assay, and thus confirmed to be positive by the Taqman RT-PCR. The threshold cycle of the positive samples ranged between 33.87 and 39.80 (median = 37.49). In addition, 17 samples were also confirmed by sequencing of the 68 bp amplification products and further alignment with the GenBank database. Therefore, 106 red deer (39.70%; 95% CI=33.83-45.57) tested positive to BVDV1 by the Taqman RT-PCR (Table 2). Prevalence of red deer among regions, fenced or not fenced estates, hunting seasons, age, sex, and ELISA results are shown in Table 2. As for cattle, four out of the 18 pools of cattle sera were positive for BVDV1 RNA detection.

Regarding the phylogenetic tree from the Taqman RT-PCR (Figure 2A),all samples included were grouped within the subgroup 1b. This finding is supported by the topology of the tree from the nested RT-PCR (Figure 2B). However, 9 out of the 17 samples sequenced from the Taqman RT-PCR were subdivided in a branch from this subgroup, including sequences from red deer (n=4) and cattle (n=5) (Figure 2A). This grouping was not apparently related to location or year of sampling.

Eleven out of the 18 study farms (61.11%) registered presence of red deer in proximity (i.e. within 2 km). The hunting bag averaged 0.24 deer per year and km^2 (ranging up to 1.8). The abundance index of red deer statistically related with an increased risk for cattle to test positive against BVDV by ELISA (F=5.85, d.f.= 178, p=0.01, β=253.7, 95% CI=48-460) (Figure 3), although no statistical difference in cattle risk was found according to red deer presence in an additional model. No statistical effects were evidenced for red deer models (i.e. ELISA and RT-PCR).

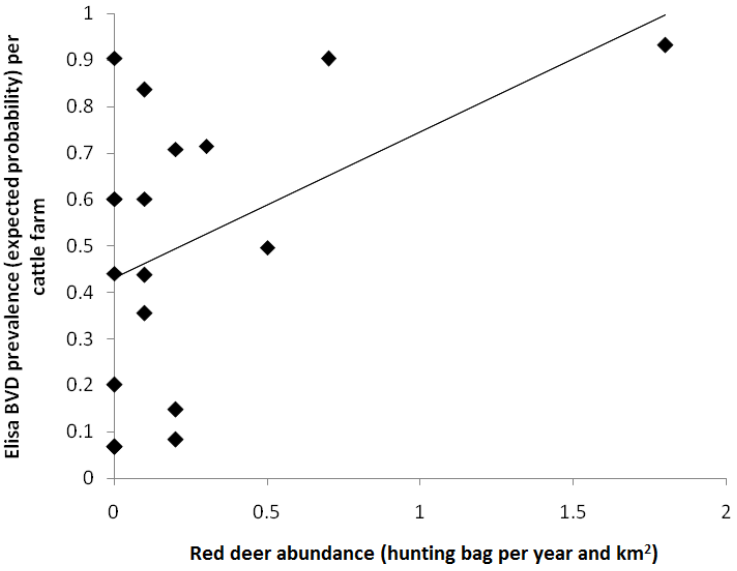


Figure 3. Relationship between the individual risk for cattle farms to test positive against BVDV by ELISA (expected probablility from GLMM) and the abundance index of red deer in proximity.

4. Discussion

While the role of cattle in BVDV maintenance is well established, the epidemiology of wild ruminants is not so clear and more difficult to assess. In this study, we performed antibody and viral determinations for BVDV in several populations of cattle and wildlife in South Central Spain. Our results suggest that BVDV is actively circulating in this area in both domestic and wild ruminants, even sharing the same sequences. In particular, BVDV seems to endemically infect red deer with high prevalences (i.e. 39.70%) at all ages and all over the study area. Moreover, the risk for extensive cattle to test BVDV-positive is significantly related to red deer abundance. This fact, together with the molecular evidence obtained, indicates a shared epidemiology of BVDV mediated by contacts at this wildlife-livestock interface. This supports the use of BVDV as a sanitary marker for interactions between wildlife (i.e. red deer) and cattle.

The presence of antibodies against pestiviruses, and specifically against BVDV, in red deer populations has been recorded in European countries over time. Seroprevalence studies have been performed in Germany, Denmark, Norway, Austria, United Kingdom, France, Italy (Frölich et al., 2012) and Switzerland (Casaubon et al., 2012; Köppel et al., 2007). In this study, our screening displayed high seroprevalences in both cattle (i.e. 45.56%) and red deer (i.e. 19.47%). Compared to the seroprevalences previously found in wild cervids over Europe, the number of seropositive animals found in the present study is high (i.e. 19.47%). However, several other studies have detected seroprevalences up to 60% in free-ranging wild ruminant populations (Elazhary et al., 1981; Van Campen et al., 2001). These high percentages may indicate an endemic circulation of the pathogen. However, it should be noted that there could be false positive sera when testing by ELISA, due to the occurrence of cross-reactions against other pestiviruses, such as the BDV (Plant et al., 1973). However, we confirmed all the positive results of the indirect test by a blocking kit, which is highly recommended for its use in wildlife (Frölich et al., 2012), and there was complete concordance of results.

The apparent BVDV prevalence in the studied population was also high (i.e. 39.70%). Taking this value together with the seroprevalence obtained, the endemicity of the disease in this region seems obvious. These results are quite reliable, given the use of this assay performed by a Taqman probe. We did not find significant age variation in prevalence among red deer. Other studies showed that infected deer may survive until adolescence (Chase et al., 2008; Duncan et al., 2008; Frölich and Hofmann, 1995; Passler et al., 2008; Van Campen et al., 2001). Nonetheless, our sampling size for fawns was limited, so future research should address this age variability in detail. Apart from that, high prevalences were maintained from yearlings to adults, evidencing that infection occurs at early ages.

A great proportion of red deer [i.e. n=111 (41.57%)] was found to be positive only to the ELISA. Though BVDV antibody kinetics in wild ruminants has not been deeply studied, antibody titers in recovered cattle may persist for years (Van Campen et al., 2008), so this finding could be related to old infections. In addition, those animals testing positive to both the ELISA and RT-PCR [n=21 (7.87%)] could have been sampled during viremia or when antibodies were starting to be produced. It could be also the case for PI fawns in their first weeks, when colostral antibodies may decrease the titers of circulating BVDV,

though it can still be detected. All these 21 animals were older than 6 months, so this seems unlikely since colostral antibodies in deer are lasting as long as in cattle (Palfi et al., 1993). Finally, there were animals testing positive only to the RT-PCR, without antibodies [n=77 (28.84%)]. This may be either due to recent infections (i.e. in the first week, when antibodies are not circulating yet) or related to PI animals. The first possibility is not very likely, since the proportion is too high for such a short event.
However, the second one seems even harder, considering that 71 out of these 77 animals were older than 2 years. All these cases show the need of more studies on immunity and pathogeny of BVDV infections in deer. Anyway, the existence of PI animals in these infected populations seems likely. These virus-shedding hosts might be responsible for the maintenance of the BVDV over generations.

Due to the wide host range of pestiviruses, wild boar samples were also tested by ELISA and RT-PCR, yielding negative results. Studies of BVDV seroprevalence in wild boar have shown low seroprevalences (i.e. ranging from 0.6-4.5%) in the Czech Republic (Sedlak et al., 2008), Croatia (Zupancic et al., 2002) or Germany (Dahle et al., 1993). Therefore, as for our results, and given that wild boar samples were taken in close proximity to hunting estates where BVDV circulation has been confirmed in red deer, we may conclude that the role of wild boar as a reservoir for BVDV is very unlikely. However, attention to the cross reactions against CSFV should be paid (Albina et al., 2000).

Though virus isolation has not been performed in this study, and amplicon sequences were not long enough, the phylogenetic analysis suggested that all the samples studied were included in the subgroup 1b. However, several samples from cattle and red deer were re-grouped in a branch of the phylogenetic tree (Figure 2), which could indicate circulation of a BVDV strain within populations of both cattle and red deer. Viruses belonging to this subgroup 1b are common, and have been described in cattle in several countries, Spain included (Arias et al., 2003; Hurtado et al., 2003). However, it seems that a different BVDV type could be circulating only among red deer. In the case of roe deer, studies in Germany (Frölich and Hofmann, 1995), Norway (Lillehaug et al., 2003) and Switzerland (Casaubon et al., 2012) indicate that the infection in this wild host can be caused by wild BVD-like strains. Further studies could focus on obtaining longer sequences and more accessible information on pestiviral strains, not only considering the 5'-UTR, but also other genes, such as the N-terminal autoprotease (Toplak et al., 2004). These studies are needed in order to fully understand the patterns of BVDV circulation and to see if there is a different pathogen circulating among different wild species and to assess their potential impact in domestic livestock.

Deer presence in and nearby extensive cattle farms is frequent in South Central Spain (Rodríguez-Prieto et al., 2012). In fact, eleven out of the 18 study farms (61.11%) registered presence of red deer in proximity (i.e. within a radius of 2 km) in this study. We observed that the abundance index of red deer statistically related to an increased risk for cattle to test BVDV-positive. This fact strongly suggests that transmission occurs at the wildlife-livestock interface, as it is also supported by molecular findings. In case that PI individuals were common among red deer, as our immunological results suggest, it could highlight the role of red deer as reservoir for BVDV.

Interestingly, abundance of cattle (and other domestic ruminants) in hunting estates did not correlate with increased risk for red deer to test positive to BVDV, supporting that red deer may represent a true reservoir for this virus, being endemic in our study area. Nonetheless, in this correlational study, we cannot state if red deer are responsible for transmitting BVDV to cattle. However, in the light of our results, these free-living wild hosts could act as a hidden reservoir of the BVDV for domestic animals, as others have previously pointed out (Vilcek and Nettleton, 2006). This condition is more likely to occur in certain epidemiological scenarios, like this area of Spain, where both wild and domestic ruminants are sharing space under specific management practices, which is ideal for the circulation and maintenance of the virus.

5. Conclusions

In this study we aimed to assess the role of BVDV as a potential marker for tracing the contact between wildlife and cattle in South Central Spain by using molecular microbiology, immunology and field epidemiology. We explored the infection by analyzing BVDV antibodies and viral genome in red deer, wild boar and cattle. Both seroprevalence and apparent prevalence observed here were high when compared to other European regions studied. Our results suggest that BVDV is endemic in red deer populations, and some strains could be circulating within wildlife itself. However, considering that there could be a common strain infecting both cattle and red deer, the relevance of red deer as a source of infection to cattle is highlighted. Conversely, wild boar seems not to constitute a major threat, maybe only acting as occasional spill-over hosts for the virus. In areas where domestic and wild ruminants share habitats, the presence of virus-shedding red deer may constitute a risk for infection in cattle, leading to obstacles in surveillance and control programs for BVD, as well as wildlife conservation plans. In summary, the interactions of extensive farmed cattle with wildlife may contribute to BVDV spill back, impeding the total success of BVD control programs. More research is needed to evidence the role of wildlife management, farming practices, habitat, and species-specific behavior and interactions determining BVDV infection in wildlife and cattle. We encourage sanitary and wildlife authorities (i) to control wildlife overabundance and other risk factors for disease transmission related to hunting estates; (ii) to mitigate contact and subsequently reduce disease transmission between wildlife and livestock; (iii) to evaluate the combined application of disease control methods towards wildlife populations; and (iv) to implement biosecurity measures in outdoor livestock farms to reduce opportunities for contacts with wild animals.

Acknowledgements

This work could not have been performed without the personal and technical help of Rocío Sánchez. The study was funded by the research project FAU2008-00004-C03 (INIA). This is also a contribution to EU FP7 EMIDA ERA-NET project APHAEA on wildlife disease surveillance. Víctor Rodríguez-Prieto holds an FPU pre-doctoral scholarship and Beatriz Martínez-López holds a Juan de la Cierva post-doctoral contract, both funded by the Spanish Ministry of Education and Science. We thank the Agriculture department of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) and its Delegation in Ciudad Real by providing samples from sanitary campaigns.

References

Albina, E., Mesplede, A., Chenut, G., Le Potier, M.F., Bourbao, G., Le Gal, S., Leforban, Y., 2000, A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. Vet Microbiol 77, 43-57.

Arias, P., Orlich, M., Prieto, M., Cedillo Rosales, S., Thiel, H.J., Alvarez, M., Becher, P., 2003, Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. Vet Microbiol 96, 327-336.

Baxi, M., McRae, D., Baxi, S., Greiser-Wilke, I., Vilcek, S., Amoako, K., Deregt, D., 2006, A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. Vet Microbiol 116, 37-44.

Casaubon, J., Vogt, H.R., Stalder, H., Hug, C., Ryser-Degiorgis, M.P., 2012, Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. BMC Vet Res 8, 204.

Chase, C.C., Braun, L.J., Leslie-Steen, P., Graham, T., Miskimins, D., Ridpath, J.F., 2008, Bovine viral diarrhea virus multiorgan infection in two white-tailed deer in southeastern South Dakota. J Wildl Dis 44, 753-759.

Dahle, J., Patzelt, T., Schagemann, G., Liess, B., 1993, Antibody prevalence of hog cholera, bovine viral diarrhoea and Aujeszky's disease virus in wild boars in northern Germany. Dtsch Tierarztl Wochenschr 100, 330-333.

Duncan, C., Van Campen, H., Soto, S., LeVan, I.K., Baeten, L.A., Miller, M.W., 2008, Persistent Bovine viral diarrhea virus infection in wild cervids of Colorado. J Vet Diagn Invest 20, 650-653.

Elazhary, M.A., Frechette, J.L., Silim, A., Roy, R.S., 1981, Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (Rangifer tarandus caribou) in Quebec. J Wildl Dis 17, 609-612.

Frölich, K., 1995, Bovine virus diarrhea and mucosal disease in free-ranging and captive deer (Cervidae) in Germany. J Wildl Dis 31, 247-250.

Frölich, K., Hofmann, M., 1995, Isolation of bovine viral diarrhea virus-like pestiviruses from roe deer (Capreolus capreolus). J Wildl Dis 31, 243-246.

Frölich, K., Marco, I., Moennig, V., 2012, Pestivirus infections, In: Gavier-Widén D., D.J.P., Meredith A. (Ed.) Infectious diseases of Wild Mammals and Birds in Europe. Wiley-Blackwell Publishing Ltd., pp. 146-167.

Giangaspero, M., Harasawa, R., 2011, Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. J Virol Methods 174, 166-172.

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.

Houe, H., 1999, Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. Vet Microbiol 64, 89-107.

Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., Aduriz, G., Juste, R.A., 2003, Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. Virus Res 92, 67-73.

Köppel, C., Knopf, L., Thür, B., Vogt, H., Meli, M., Lutz, H., Stärk, K.D., 2007, Bovine virus diarrhea and the vector-borne diseases Anaplasmosis and Bluetongue: a sero-surveillance in free-ranging red deer (Cervus elaphus) in selected areas of Switzerland. European Journal of Wildlife Research 53, 226-230.

Lillehaug, A., Vikoren, T., Larsen, I.L., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Handeland, K., 2003, Antibodies to ruminant alpha-

herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. J Wildl Dis 39, 779-786.

Martin, C., Pastoret, P.-P., Brochier, B., Humblet, M.-F., Saegerman, C., 2011, A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe. Vet Res 42, 70.

Palfi, V., Houe, H., Philipsen, J., 1993, Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. Acta Vet Scand 34, 105-107.

Passler, T., Ditchkoff, S.S., Givens, M.D., Brock, K.V., DeYoung, R.W., Walz, P.H., 2010, Transmission of bovine viral diarrhea virus among white-tailed deer (Odocoileus virginianus). Vet Res 41, 20.

Passler, T., Walz, P.H., Ditchkoff, S.S., Brock, K.V., Deyoung, R.W., Foley, A.M., Daniel Givens, M., 2009, Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with Bovine viral diarrhea virus results in persistently infected fawns. Vet Microbiol 134, 362-367.

Passler, T., Walz, P.H., Ditchkoff, S.S., Givens, M.D., Maxwell, H.S., Brock, K.V., 2007, Experimental persistent infection with bovine viral diarrhea virus in white-tailed deer. Vet Microbiol 122, 350-356.

Passler, T., Walz, P.H., Ditchkoff, S.S., Walz, H.L., Givens, M.D., Brock, K.V., 2008, Evaluation of hunter-harvested white-tailed deer for evidence of bovine viral diarrhea virus infection in Alabama. J Vet Diagn Invest 20, 79-82.

Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., Tussen, P., 1994, Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology 203, 260-268.

Plant, J.W., Littlejohns, I.E., Gardiner, A.C., Vantsis, J.T., Huck, R.A., 1973, Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. Vet Rec 92, 455.

Richomme, C., Gauthier, D., Fromont, E., 2006, Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. Epidemiol Infect 134, 21-30.

Ridpath, J.F., Bolin, S.R., Dubovi, E.J., 1994, Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virology 205, 66-74.

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J.A., Acevedo, P., Romero, B., Rodriguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Vicente, J., 2012, A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. BMC Vet Res 8, 148.

Sáenz de Buruaga, M., Lucio, A.J., Purroy, F.J., 1991, Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticasVitoria-Gasteiz.

Sedlak, K., Bartova, E., Machova, J., 2008, Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. J Wildl Dis 44, 777-780.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.

Toplak, I., Sandvik, T., Barlic-Maganja, D., Grom, J., Paton, D.J., 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. Vet Microbiol 99, 175-185.

Van Campen, H., Frölich, K., Hofmann, M., 2008, Pestivirus infections, In: Williams, E.S., Barker, I. K. (Ed.) Infectious Diseases of Wild Mammals, Third Edition. Iowa State University Press, Ames, pp. 232-244.

Van Campen, H., Ridpath, J., Williams, E., Cavender, J., Edwards, J., Smith, S., Sawyer, H., 2001, Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. Journal of Wildlife Diseases 37, 306-311.

Vilcek, S., Nettleton, P.F., 2006, Pestiviruses in wild animals. Vet Microbiol 116, 1-12.

Wizigmann, G., 1984, Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Diasease und Border Diaseas. Tierärztliche Umschau 39, 174-178.

Zhong, F., Li, N., Huang, X., Guo, Y., Chen, H., Wang, Z., Shi, C., Zhang, X., 2010. Genetic typing and epidemiologic observation of bovine viral diarrhea virus in Western China. Virus Genes 42, 204-207.

Zupancic, Z., Jukic, B., Lojkic, M., Cac, Z., Jemersic, L., Staresina, V., 2002, Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49, 253-256.

Objetivo 6

Valorar la potencial utilización de la termografía infrarroja para el estudio de especies silvestres, tomando como modelo el estudio del patrón térmico de morsas del Pacífico en cautividad

Composición propia. Fuente de las imágenes originales: toma de fotografías por V. Rodríguez, M. Melero y A. Rubio en el Oceanogràfic (Valencia)

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 6

La **termografía infrarroja** es una técnica de gran valor a la hora de identificar procesos fisiológicos o patológicos que cursen con cambio de temperatura superficial de los animales. Sus características la convierten en una técnica de elección para aplicar en fauna silvestre, sobre todo debido a que es no invasiva y a que ofrece grandes opciones analíticas posteriores. Sin embargo, se debe conocer el patrón térmico normal de cada especie para poder detectar cualquier variación. En concreto, los mamíferos marinos suponen un reto especial. Debido a su condición anfibia, los pinnípedos cuentan con diversas estrategias que les permiten mantener una temperatura adecuada cuando salen del agua. Para optimizar este proceso de termorregulación, estos animales pueden utilizar mecanismos vasculares mediante los cuales varían el flujo sanguíneo en la piel o las aletas, lo que les permite ajustar su temperatura según las necesidades. Estas regiones corporales, conocidas como **ventanas térmicas**, han sido descritas para varias especies de pinnípedos. Sin embargo, el mecanismo resultaba desconocido en el caso de las morsas (*Odobenus rosmarus*). Así pues, el objetivo de este trabajo fue estudiar el patrón de formación y desarrollo de ventanas térmicas en cinco individuos de morsa del Pacífico (*O. rosmarus divergens*) en cautividad a través de la termografía. Para ello, se plantearon varias visitas del Oceanogràfic (Valencia). Las sesiones termográficas consistieron en la toma de termogramas en la parte seca de la instalación, donde se tomaron además las temperaturas ambientales. Todos los animales desarrollaron ventanas térmicas en todas las sesiones, pero se observaron diferencias en cuando a la forma, tamaño, localización, número, velocidad de desarrollo y temperatura, no solo entre individuos, sino incluso en cada individuo entre las diferentes sesiones. Por tanto, este estudio demuestra el proceso de termorregulación de las morsas en un ambiente controlado, lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de valorar cualquier tipo de patología en estos animales a través de la termografía infrarroja. Se pone además de manifiesto la utilidad de esta técnica para ampliar los conocimientos acerca de especies silvestres.

Publicación principal de este objetivo

Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., Melero, M., García, D. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment**. *Marine Mammal Science* 29(1), 167-176.

Aportaciones científicas relacionadas

➢ *Publicaciones científicas indexadas*

- Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., García, D. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión). **Thermal reference points as index for monitoring body core temperature in marine mammals**. *BMC Research Notes*.
- Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Delclaux, M., García-Millán, I., Martínez-Nevado, E., Fernández-Morán, J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión). **Diagnosis and monitoring of pregnancy in Rothschild's giraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*) by infrared thermography**. *BMC Veterinary Research*.

➢ *Congresos*

- Rubio, A., Rodríguez, V., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2007). **Detección de las ventanas térmicas en la morsa (*Odobenus rosmarus*)**. Comunicación oral en el *VII Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.
- Melero, M., Rodríguez, V., Rubio, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2007). **Aplicación de la termografía para el estudio de los mamíferos marinos: delfín mular, beluga, león marino de la Patagonia y foca vitulina**. Comunicación oral en el *VII Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.
- Rodríguez, V., Rubio, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2007). **Utilización de la termografía en el ganado porcino**. Comunicación oral en el *VII Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.
- Melero, M., García, D., Rodríguez, V., Rubio, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). **New generation thermographic cameras: a readily available technique with a high potential for the marine mammal practitioner**. Comunicación oral en el *2008 European Association for Aquatic Mammals (EAAM) Symposium*, Kolmården (Suecia).

- Rubio, A., Rodríguez, V., Melero, M., García, D., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). **Thermography in walruses: preliminary considerations on thermoregulation**. Comunicación oral en *39th Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM)*, Roma (Italia).
- García-Millán, I., Aguilar, L., Rodríguez, V., Melero, M., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Termografía aplicada al diagnóstico de gestación en jirafas**. Comunicación oral en el *XI Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Odontología de la UCM, Madrid.
- Aguilar, L., García-Millán, I., Melero, M., Rodríguez, V., Delclaux, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Aplicación de la termografía infrarroja al estudio de la termorregulación en lémures de cola anillada y casuarios**. Comunicación oral en el *XI Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Odontología de la UCM, Madrid.

➢ *Ponencias*

- Pérez de Diego, A. C., Melero, M., Rodríguez, V., Rubio, A., Sanz, A., Vicente, M., Rojas, P., Vinuesa, L., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2007). **Termofotografía: una nueva herramienta diagnóstica**. Ponencia en el *I Congreso Multitemático*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.

MARINE MAMMAL SCIENCE, 29(1): 167–176 (January 2013)
© 2011 by the Society for Marine Mammalogy
DOI: 10.1111/j.1748-7692.2011.00533.x

Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment

VÍCTOR RODRÍGUEZ-PRIETO
ANA RUBIO-GARCÍA
MAR MELERO
VISAVET, Veterinary School,
Complutense University of Madrid,
Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain
E-mail: victor@sanidadanimal.info

DANIEL GARCÍA
Department of Veterinary Medicine,
L'Oceanogràfic,
Junta de Murs i Valls s/n, 46013 Valencia, Spain

JOSÉ MANUEL SÁNCHEZ-VIZCAÍNO
VISAVET, Veterinary School,
Complutense University of Madrid,
Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Marine mammals maintain thermal equilibrium not only by relying on a layer of insulation (*e.g.*, fur or blubber) and a body shape with a relatively low surface-to-volume ratio, but also by adjusting blood flow to the skin and appendages (Bryden and Molyneux 1978, Molyneux and Bryden 1978, Hokkanen 1990, Dehnhardt *et al.* 1998, Boyd 2000). These areas of adjustable blood flow, known as thermal windows, act as heat-dissipaters or heat-conservers depending on the needs of the animal (Tattersall *et al.* 2009). For example, cetaceans have circulatory plexuses to enable counter-current heat transfer in the dorsal fin, the pectoral flippers and the flukes (Scholander and Schevill 1955). Among otariids, fur seals appear to use their flippers for removing heat excess while swimming (Bryden and Molyneux 1978), whereas Willis *et al*. (2005) demonstrated higher heat flux values around the hips and shoulders than in flippers of swimming and stationary Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). Phocids, in contrast, appear to use the extremities and the trunk for heat dissipation (Molyneux and Bryden 1978). In these species these areas of increased heat exchange are most often the result of arteriovenous anastomoses (AVAs), which control the passage of blood to the surface of the body to cool it (Krumbiegel 1933, Øritsland 1968, Bryden and Molyneux 1978, Molyneux and Bryden 1978, Mauck *et al.* 2003). While a great deal of research on thermal windows has been done in these two families of pinnipeds, no research has been published on the third family, the *Odobenidae* (walruses). The aim of this study was to identify whether the pattern in

which thermal windows are presented and develop across the walruses' body surface is similar to phocid seals, mainly over the trunk, or concentrated near the extremities, as in otariids.

Skin thermal patterns were measured by infrared thermography, which captures thermal radiation emitted and reflected from different materials, and converts it into radiative temperature according to the Stefan-Boltzmann equation (Speakman and Ward 1998). The temperature values in the thermal digital images are strongly related to the emissivity, which is the relative ability of a surface to emit and absorb radiation and ranges between 0.95 and 0.98 for biological materials (Speakman and Ward 1998). Infrared thermography has been used for the study of thermal physiology of insects, reptiles, birds, and mammals (see Willis *et al.* 2005, McCafferty 2007, McCafferty *et al.* 2011). This approach also presents many advantages for diagnosis (McCafferty 2007), as it is a noninvasive technique that can detect variations in body surface temperature due to external heating, trauma, inflammation, infection, neurological processes, and heat emission from internal organs (Walsh and Gaynor 2001). However, it is necessary to determine the normal physiological thermal patterns of a given species and the most common artifacts prior to using thermography as a diagnostic tool.

Five juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens* Illiger, 1815) born in June 2003 (four females and one male) were imaged. The animals were housed in an indoor facility at L'Oceanogràfic zoological park (Valencia, Spain) where air temperature (T_{air}) was controlled and maintained between 15°C and 18°C. The water temperature (T_{water}) for the walrus habitat was 15.2 ± 0.6°C. The ambient light source was indoor lighting consisting of metal halide lamps. Thermograms were recorded in April 2008 during five ~15 min sessions during their normal feeding periods and one longer session of ~1 h during a training period. Prior to the thermographic sessions animals were observed in the pool and normal activity patterns were noted. All walruses were in good body condition and their skin was free of any visual abnormality, but they had sparse hair, which is common in many managed environments. To start the sessions, walruses hauled out onto the deck under training control and were led to a dry area in the behind-the-scenes facility, where they were thermographed immediately and at intervals of 30 s to 2 min. Animals were maintained in a sternal position, and body areas which were in contact with the floor were excluded from the analysis, because this may result in trapping of heat from decreased radiation.

We followed several criteria to distinguish thermal windows from other heat signatures or "warm areas" (Fig. 1) since both types are presented as hot spots in the skin. Thermal windows increased their temperature and expanded their area throughout all the sessions, and they did not appear in fixed locations when the animals were scanned after subsequent immersions. On the other hand, warm areas that may result from dermatologic lesions, repetitive pool contact such as abrasions or swimming patterns or trauma from conspecifics (*e.g.*, tusk marks) were present since the beginning of the sessions and their shape did not change over time. To verify these criteria, at least two images of the same animal from different moments were needed. Accordingly, we excluded warm areas from the analysis. In addition, vibrissal pads, eyes, and adjacent areas were excluded because these areas are thought to possess additional heating mechanisms to preserve their capability underwater, as well as for thermoregulatory differences (Mauck *et al.* 2000, Harington 2008).

Thermograms were obtained using a ThermaCAM E45 Infrared Camera (FLIR, Burlington, ON, Canada) with a thermal sensitivity of 0.1°C at 25°C. Images were

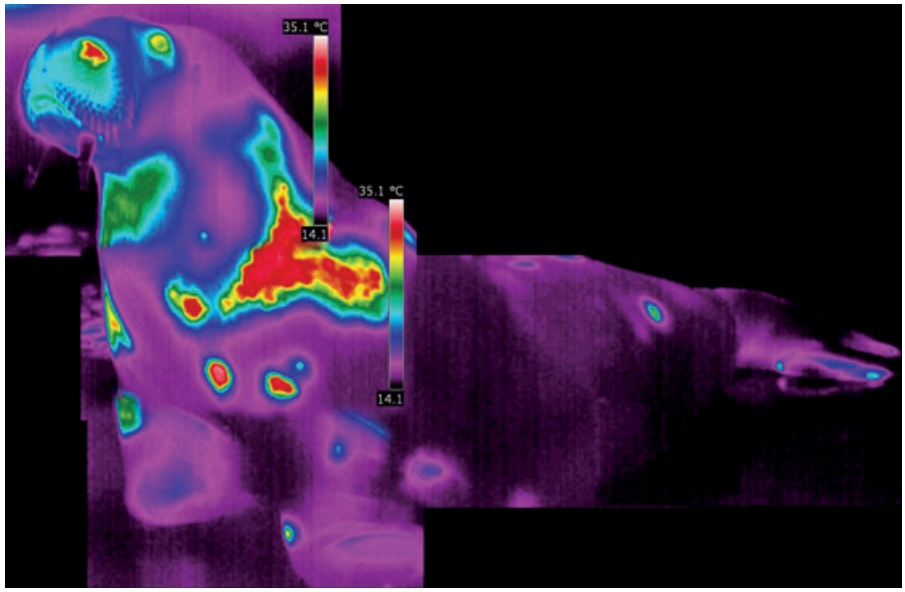


Figure 1. Composite thermogram of a juvenile male walrus taken 11 min after it left the water. Several thermal windows can be observed in the chest, the left posterior flank and the fore and hind flippers as small, circular areas of higher temperature than the rest of the body. The temperature transition area (dark blue) can be observed surrounding the thermal window. Note the large warm area in the left shoulder region, which was thought to be a result from a rubbing behavior.

stored as JPEG files and analyzed using the ThermaCAM QuickReport 1.0 software (FLIR). Multiple thermograms were taken during each session and were analyzed using the rainbow color palate. In order to compare and interpret the thermograms, the temperature-color scale for most of the images was adjusted so that 35°C was the maximum (white) and 16.5°C the minimum (black). In some scans the temperature range was modified to allow better image comparison between sessions. When thermograms failed to capture the entire target surface area, composite thermograms were prepared by fusing several images taken during the same session and with the same color scale.

To ensure the most accurate results, temperature values were also adjusted to the parameters of ambient temperature, relative humidity, distance from the animals, and emissivity. An emissivity of 0.95 was selected for all scans. Due to the potential temperature artifacts associated with the viewing angle (Speakman and Ward 1998, McCafferty *et al.* 2011) the outer perimeters of the thermograms were not included in the analysis. Temperature values were calculated by the QuickReport program for areas of thermal windows and profile lines (Fig. 2, 3) where maximum (T_{max}) and minimum temperatures were examined. These profile lines, drawn in some thermograms as linear sections across thermal windows, allow us to examine the variations of temperature values between thermal windows and their surrounding skin over their development.

Thermal windows were detected in all five walruses in each recording session (Table 1). Some windows were visible immediately after the animals left the water.

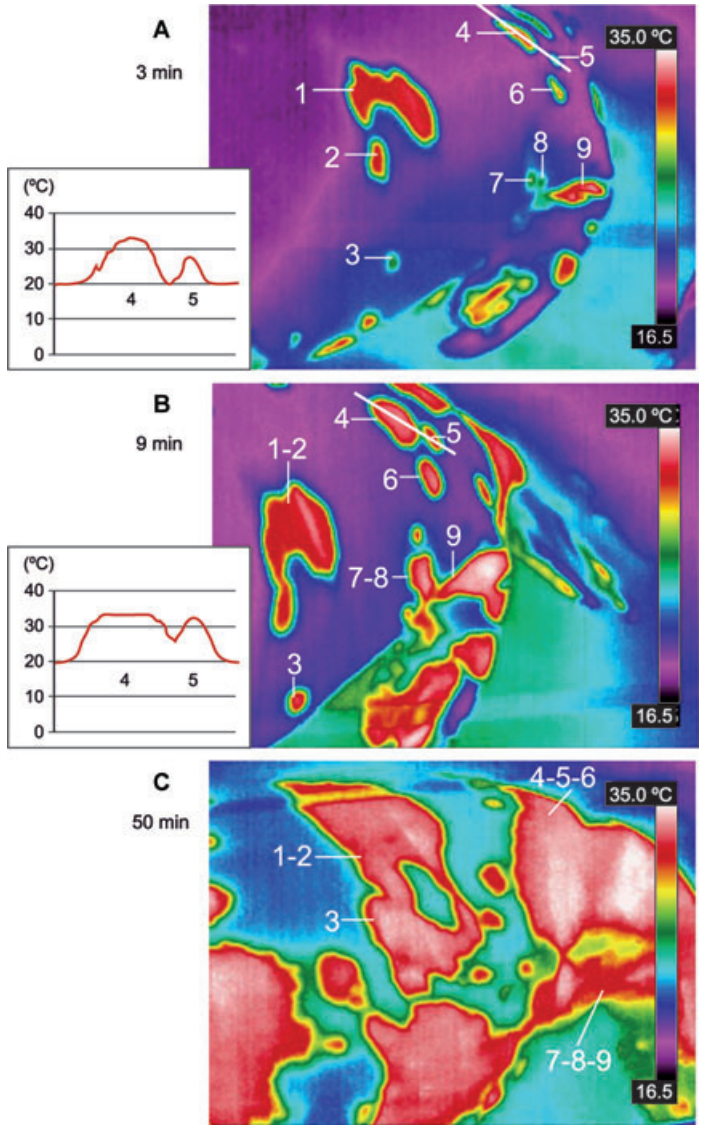


Figure 2. Thermograms and profile lines of the left posterior side and hind flippers of a juvenile female walrus. (A) A thermogram taken when the animal had been out of the water for 3 min. Nine thermal windows are labeled (1–9) from cranial to caudal and from dorsal to ventral. At this point, the windows have different sizes; numbers 3, 7, and 8 have just appeared. They have different temperatures (T_{max} = 26.1°C–33.8°C), but all are warmer than the rest of the body surface (17.5°C–20.4°C). (B) Taken when the animal had been out of the water for 9 min. The windows observed at 3 min have become warmer (T_{max} = 32.3°C–35.0°C) and wider, and they are fusing (such as numbers 1 and 2). (C) Taken after the animal had been out of the water for 50 min. By this time, many thermal windows have fused and exhibit similar temperatures (T_{max} = 34.4°C–35.4°C). We could not follow the same profile line because the walrus changed the position relative to the camera.

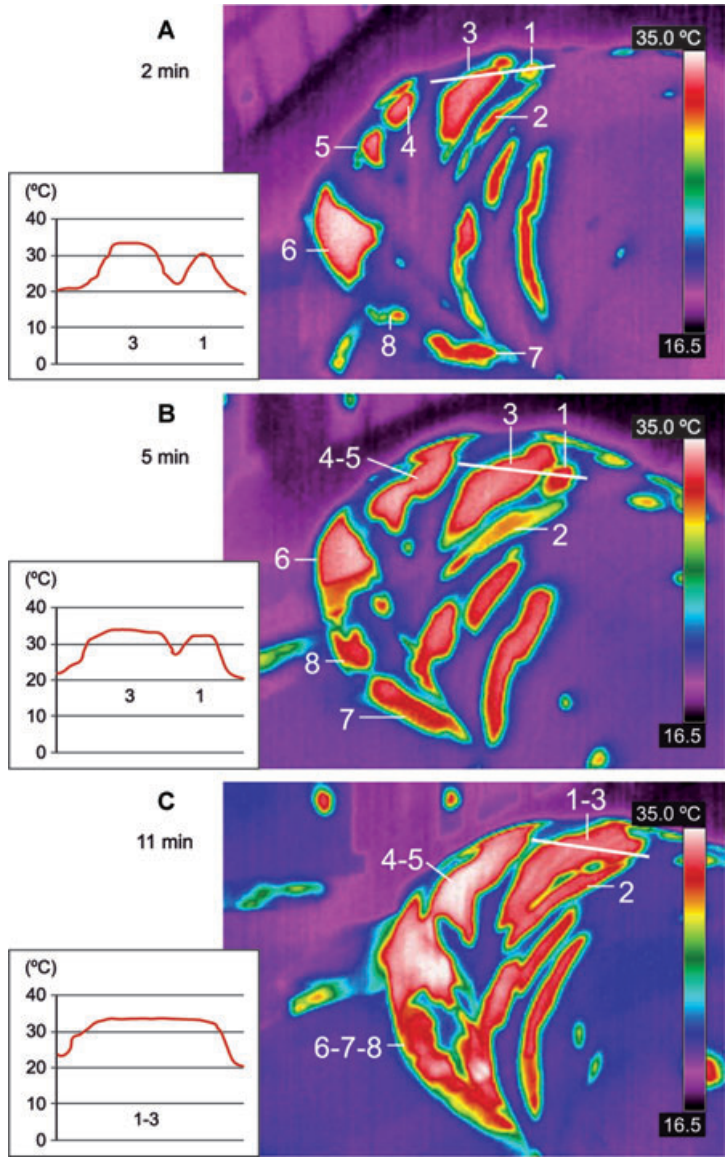


Figure 3. Thermograms and profile lines of the right posterior abdomen and pelvis of a juvenile female walrus. (A) Taken when the walrus had been out of the water for 2 min. Eight thermal windows have been numbered (1–8) from cranial to caudal and from dorsal to ventral. At this moment, the animal presents variability in thermal windows, not only in size but also in temperature (T_{max} = 30.7°C–34.8°C). Note that thermal windows number 3 and 4 are the result of the fusing process between early adjacent windows. (B) Taken after 5 min. Every thermal window has increased in size and temperature (T_{max} = 32.0°C–34.5°C). The fusion between thermal windows number 4 and 5 is complete. (C) Thermogram taken after 11 min. Thermal windows cover a wider area of the skin of the walrus. Fusion processes are obvious in the whole area. Temperature continues to rise (T_{max} = 34.5°C–35.5°C).

Table 1. Summary data for the thermal window patterns observed in walruses in all the recording sessions. The data are displayed for four time points: 0, 5, 10, and 60 min from the moment of exiting the water. T_{max} and ΔT are means of the total of thermal windows examined in each session at each time point. Several significant body parts have been chosen to explain the frequency of occurrence of thermal windows on the body skin: head, trunk, fore flippers, shoulders, hind flippers, and hips.

Time points (min)	Number of sessions (N)	Temperature analysis of thermal windows (mean ± SD) (°C)		Proportion of sessions in which thermal windows appeared in body regions of interest (*n*/*N*) (%)[c]					
		T_{max}[a]	ΔT[b]	Head	Trunk	Fore flippers	Shoulders	Hind flippers	Hips
0	6	30.42 ± 2.66	11.42 ± 2.78	0/6 (0%)	6/6 (100%)	4/6 (67%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
5	6	32.13 ± 2.06	12.01 ± 2.15	0/6 (0%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
10	6	34.36 ± 0.67	13.71 ± 0.63	0/6 (0%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	2/6 (33%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
60[d]	1	35.20 ± 0.30	11.13 ± 0.65	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)

[a] T_{max}: mean of the maximum temperatures measured in the whole set of thermal windows observed at each time period.
[b] ΔT: mean of the temperature differences between the T_{max} of each thermal window analyzed in this time and the surrounding skin.
[c] *n*/N: *n* refers to the number of sessions in which at least one thermal window appears in this body region, while *N* refers to the total of sessions in which thermal windows were looked for. The proportions are presented in ratios and percentages.
[d] Data for this time point could only be gathered from one session of ~1 h.

They tended to appear first as small, circular-like areas of the body surface where the temperature was higher than the surrounding skin (ΔT): for instance, Figure 2A, thermal window number 3 (TW3) ($\Delta T = 6.0$ K; $T_{max} = 27.2°$C); Figure 3A, TW1 ($\Delta T = 7.4$ K; $T_{max} = 26.6°$C). The thermal windows were variable in shape, but always surrounded by a transition zone. These areas separated them from the rest of the body surface, with a lower temperature than the thermal window but warmer than the outer skin (Fig. 1).

During the recording sessions, new thermal windows developed. The previous ones increased in size and their temperature rose: for example, Figure 2B, TW3 ($\Delta T = 12.5$ K; $T_{max} = 32.8°$C); Figure 3B, TW3 ($\Delta T = 13.3$ K; $T_{max} = 34.1°$C). Once a thermal window appeared, it remained visible until the end of the session, with the center remaining approximately in the same place as its initial appearance site. As the windows grew larger, adjacent areas fused, giving rise to even larger windows (*e.g.*, Fig. 2B, C, TW1–2, TW4–5–6, TW7–8; Fig. 3C, TW1–2–3, TW4–5, TW6–7–8). During this process, the transition zones persisted around the windows.

From the early to the most developed stage, all thermal windows tended to reach a similar, high temperature, as could be seen in the profile lines (Fig. 2, 3) and the homogenization of temperature values when comparing the differences along the session: for instance, Figure 2A (mean of T_{max} of all thermal windows ± standard deviation = 29.89 ± 2.85°C) compared to Figure 2C ($T_{max} = 34.83 \pm 0.44°$C); Figure 3A ($T_{max} = 32.77 \pm 1.39°$C) compared to Figure 3C ($T_{max} = 35.04 \pm 0.44°$C). In addition, temperature values inside each thermal window tended to equalize, as seen in the plateau-like peaks of the profile lines (Fig. 2, 3). The highest temperature registered in the whole study was 35.9°C, in the ~1 h session, in the last thermogram taken (at 64 min after hauling out). Thermal windows did not appear to have fixed locations, since within each session and over the course of the six sessions they appeared over the entire body surface of the animals without significant differences among them, being present in the chest, abdomen, back, flanks, and fore and hind flippers (Table 1). However, we observed thermal windows in the head only at the end of the ~1 h session, and their appearance in the front extremities tended to be slower.

The pattern of thermal window development has been specifically described in several species of aquatic mammals, such as otters (Kuhn and Meyer 2009), cetaceans (McGinnis *et al.* 1972, Meagher *et al.* 2002), sea lions (Willis *et al.* 2005) and phocids (Mauck *et al.* 2003). Our results show the pattern of thermal window appearance and development in juvenile walruses under a specific set of controlled environmental conditions. Differences were observed in the shape, size, location, number, speed of development and temperature of the thermal windows between individuals, and also within the same individual in different sessions. Variations in T_{air} and T_{water} between sessions were minimal, so there are likely other variables and possible explanations for the differences observed between individual walrus thermal window patterns. Previous studies on thermoregulation have revealed the important role of the circulatory system, as in the case of AVAs in seals (Mauck *et al.* 2003). The density and position of these vessels seem to be the main factors that affect the efficacy of heat dissipation in pinnipeds (Bryden and Molyneux 1978, Molyneux and Bryden 1978). The existence of a similar system in walruses is unknown, since no physiological studies of dermal vascular system of these animals have been published. If the circulatory system is responsible for the appearance of thermal windows, it would explain all the differences observed in size, shape, and location between

different animals and even in the same animal at different times. The implication of AVAs would also be consistent with the observed pattern that thermal windows develop in restricted areas: if they covered the whole surface, too much blood would be sent to the periphery, and the blood pressure would be too low to ensure proper perfusion of the main organs (Mauck *et al.* 2003). In any case, when out of the water for a period of time, individuals in the wild and controlled environments would be expected to return to the water to relieve overheating before becoming compromised by hyperthermia.

On the other hand, the environmental conditions could explain the differences observed for number, speed of development and temperature of the thermal windows. In this study, walruses were kept in an indoor facility where the water was tightly controlled ($T_{water} = 15.2 \pm 0.6°C$) and variations of the air were kept to a narrow range ($T_{air} = 15°C–18°C$). However, wild walruses naturally experience colder thermal gradients in their polar habitat, living at temperatures below $-35°C$ on land and near to $0°C$ in the water. Exposed to these extreme conditions, they are prepared anatomically and physiologically to deal with a wide range of colder temperatures as should other polar pinnipeds, such as some phocid seals (Mauck *et al.* 2003). Walruses and seals both have thick layers of blubber, while their fur is not waterproof and provides little insulation (Williams and Worthy 2002). Both seals and walruses develop thermal windows in their skin for losing excess heat when hauled out, as this study and Mauck *et al.*'s (2003) show. Thermal windows in this and previously published studies appear along the body surface in all sessions and in all animals. They present similarities in the form of appearance, size and structure (*i.e.,* small, circular areas, surrounded by peripheral transition zones, in "random" body sides, but opposite to the lying areas) as well as the fusing tendency between adjacent areas. Thermal windows in walruses were generally warmer and faster-growing than the majority of the seals' results presented in the winter session ($T_{air} = 5°C–12°C$, $T_{water} = 5.7°C–11.4°C$), whereas the walrus pattern seemed the most similar to the harbor seal thermograms taken in summer sessions ($T_{air} = 32°C–36°C$, $T_{water} = 15.6°C–21.5°C$) (Mauck *et al.* 2003). These considerations highlight the effect of environmental conditions on the thermal window development. The warmer environmental conditions in both species (up to $15°C$ higher for the walrus than polar waters) seem to lead to a faster rise in peripheral tissue temperature and more rapid development of thermal windows. Since walruses and seals belong to distinct pinniped families, the observed differences may also reflect different evolutionary pathways (Heyning and Lento 2002).

All five walruses in this study showed thermal windows primarily in the hind flippers (Table 1), which are used to propel them through water, as well as seals. Otariids, however, use primarily the fore flippers for locomotion. It would be interesting to examine whether thermal windows in otariids appear sooner in fore flippers than in hind ones. While both cetaceans and pinnipeds undoubtedly use their flippers as thermal windows (Williams and Worthy 2002), our study verifies that, unlike cetaceans, walruses also have thermal windows in the skin. This could be related to the fact that cetaceans spend their entire life underwater and need not deal with the risk of hyperthermia that blubber poses for animals on land (except for those cetaceans that inhabit warm areas). As amphibious marine mammals, and with the loss of ability of the highly efficient heat transfer in water when hauled out, pinnipeds must be able to rapidly exchange additional amounts of body heat through their blubber, which they can achieve using thermal windows along their body surface. This same system may be used by pinnipeds to gather heat by sunning

when cold or to allow them to remain out of the water for extended periods of time for breeding, nursing, and protecting their pups, or to avoid water-based predators.

Comparative research with wild walrus at different seasonal temperatures is needed to better understand the function and significance of thermal windows in this species. Future controlled environmental studies should expose the animals to different water and air temperatures for scanning the areas of interest but care must be taken to allow them return to water for cooling or to monitor core temperature during the investigation to avoid overheating. Behavior and respirations should also be monitored for signs of thermal stress and limits placed on thermal sessions. Anatomical and histological studies of walrus skin would help to clarify the physiological capability of walruses for thermoregulation. The patterns of normal thermal windows should be considered whenever thermography is used to study areas associated with abrasions, inflammation from dermal lesions such as dermatophytes and trauma sites such as from breeding behavior, since these may show up prior to the physiologic windows.

Acknowledgments

Special recognition is given to the Ministry of the Environment and Rural and Marine Affairs of Spain (MARM) and the Ministry of Education (FPU grant) for its financial support. We thank the staff of the Arctic Facilities of L'Oceanogràfic for their assistance. We also acknowledge the efforts of the staff of the Periodicals Library of the Veterinary School of Complutense University of Madrid, especially Carmen Muñoz, who helped us with the bibliography review. The authors are grateful to Armando Chapin Rodriguez and two anonymous reviewers for helpful improvements to the draft.

Literature Cited

Boyd, I. L. 2000. Skin temperatures during free-ranging swimming and diving in Antarctic fur seals. Journal of Experimental Biology 203:1907–1914.

Bryden, M. M., and G. S. Molyneux. 1978. Arteriovenous anastomoses in the skin of seals. II. The California sea lion *Zalophus californianus* and the northern fur seal *Callorhinus ursinus* (Pinnipedia: Otariidae). Anatomical Record 191:253–260.

Denhardt, G., B. Mauck and H. Hyvärinen. 1998. Ambient temperature does not affect the tactile sensitivity of mystacial vibrissae in harbour seals. Journal of Experimental Biology 201:3023–3029.

Harington, C. R. 2008. The evolution of Arctic marine mammals. Ecological Applications 18:S23–S40.

Heyning, J. E., and G. M. Lento. 2002. The evolution of marine mammals. Pages 38–72 *in* A. R. Hoelzel, ed. Marine mammal biology: An evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford, UK.

Hokkanen, J. E. 1990. Temperature regulation of marine mammals. Journal of Theoretical Biology 145:465–485.

Kuhn, R. A., and W. Meyer. 2009. Infrared thermography of the body surface in the Eurasian otter *Lutra lutra* and the giant otter *Pteronura brasiliensis*. Aquatic Biology 6:143–152.

Krumbiegel, I. 1933. Untersuchungen über Körpergestalt und Wärmehaushalt der Säugetiere, besonders der aquatilen Formen. Biologisches Centralblatt 53:123–148.

Mauck, B., U. Eysel and G. Dehnhardt. 2000. Selective heating of vibrissal follicles in seals (*Phoca vitulina*) and dolphins (*Sotalia fluviatilis guianensis*). Journal of Experimental Biology 203:2125–2131.

Mauck, B., K. Bilgmann, D. D. Jones, U. Eysel and G. Dehnhardt. 2003. Thermal windows on the trunk of hauled-out seals: Hot spots for thermoregulatory evaporation? Journal of Experimental Biology 206:1727–1738.

McCafferty, D. J. 2007. The value of infrared thermography for research on mammals: Previous applications and future directions. Mammal Review 37:207–223.

McCafferty, D. J., C. Gilbert, W. Paterson, P. P. Pomeroy, D. Thompson, J. I. Currie and A. Ancel. 2011. Estimating metabolic heat loss in birds and mammals by combining infrared thermography with biophysical modeling. Comparative Biochemistry and Physiology 158A:337–345.

McGinnis, S. M., G. C. Whittow, C. A. Ohata and H. Huber. 1972. Body heat dissipation and conservation in two species of dolphins. Comparative Biochemistry and Physiology 43A:417–423.

Meagher, E. M., W. A. McLellan, A. J. Wetsgate, R. S. Wells, D. Frierson Jr. and D. A. Pabst. 2002. The relationship between heat flow and vasculature in the dorsal fin of wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Journal of Experimental Biology 205:3475–3486.

Molyneux, G. S., and M. M. Bryden. 1978. Arteriovenous anastomoses in the skin of seals. I. The Weddell seal *Leptonychotes weddelli* and the elephant seal *Mirounga leonina* (Pinnipedia: Phocidae). Anatomical Record 191:239–252.

Øritsland, N. A. 1968. Variation in the body surface temperature of the harp seal. Acta Physiologica Scandinavica 73:35A–36A.

Scholander, P. F., and W. E. Schevill. 1955. Counter-current vascular heat exchange in the fins of whales. Journal of Applied Physiology 8:279–282.

Speakman, J. R., and S. Ward. 1998. Infrared thermography: Principles and applications. Zoology 101:224–232.

Tattersall, G. J., D. V. Andrade and A. S. Abe. 2009. Heat exchange from the toucan bill reveals a controllable vascular thermal radiator. Science 325:468–470.

Walsh, M. T., and E. V. Gaynor. 2001. Thermal imaging of marine mammals. Pages 643–652 *in* L. Dierauf, and F. M. D. Gulland, eds. CRC handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press, Florida, FL.

Williams, T. M., and G. A. J. Worthy. 2002. Anatomy and physiology: The challenge of aquatic living. Pages 73–97 *in* A. R. Hoelzel, ed. Marine mammal biology: An evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford, UK.

Willis, K., M. Horning, D. A. S. Rosen and A. W. Trites. 2005. Spatial variation of heat flux in Steller sea lions: Consistent avenues of heat exchange along the body trunk. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 315:163–175.

5. DISCUSIÓN

Fuente de la imagen: fotografía propia

5. DISCUSIÓN

Históricamente ha habido una falta de integración entre los sistemas de vigilancia de enfermedades de humanos, animales domésticos y fauna silvestre (Kuiken *et al.*, 2005). La delicada separación entre las instituciones y organizaciones gubernamentales encargadas de estas actividades ha desembocado en una independencia en sus operaciones durante mucho tiempo. Sin embargo, ha surgido un renovado interés por alentar un espíritu global e integral en la manera de entender la sanidad (OIE, 2010). De este modo se acepta que el éxito de la gestión sanitaria y la consecución de un estatus sanitario adecuado a nivel global solo son alcanzables a través de la **integración de las actividades de sanidad animal, salud pública y gestión del medioambiente**.

El concepto **"Un mundo, una salud"** (*One World, One Health*) surge en 2004 en una conferencia de la *Wildlife Conservation Society* con el fin de integrar la prevención, la vigilancia y el control de las enfermedades infecciosas a todos los niveles (OIE, 2010). Esto exige la creación de una red de intercambio de información sanitaria, la coordinación de programas y políticas internacionales y el compromiso de colaboración entre todos los organismos implicados en la salud pública, la sanidad animal y la gestión medioambiental. De esta manera, se propone aunar esfuerzos por parte de administraciones públicas nacionales e internacionales, epidemiólogos, laboratorios de diagnóstico, instituciones académicas, economistas, sociólogos, médicos, veterinarios de campo, productores, ecólogos y expertos en fauna silvestre.

En esta línea, esta tesis doctoral se plantea como un **estudio integral de la fauna silvestre y sus enfermedades infecciosas**. Para ello, se han elegido varias **enfermedades emergentes** (una zoonósica, la EWN, y una no zoonósica, la ESB, ambas **vectoriales**) y **endémicas** (una zoonósica, la TB, y dos no zoonósicas, el SRRP y la DVB) para abarcar distintos aspectos epidemiológicos de las enfermedades compartidas, así como **distintas especies silvestres**. Además, se han utilizado diferentes **metodologías diagnósticas y epidemiológicas** para estudiar la relevancia de los animales silvestres en la transmisión de patógenos en la interfaz HDS y para ampliar conocimientos relacionados con la inmunología y la fisiología aplicables a la gestión sanitaria.

5.1 Expansión del campo de conocimiento de las enfermedades infecciosas en fauna silvestre

La mayoría de las investigaciones sobre temas de actualidad requiere la realización previa de una revisión sobre el "estado del arte". En el caso de la presente tesis, esta revisión bibliográfica ha permitido conocer las tendencias de publicación sobre las enfermedades infecciosas en fauna silvestre en los últimos 25 años. De esta manera, la revisión pone en contexto esta tesis, a la vez que enfoca cuáles son las especies animales y las enfermedades que más preocupan en el panorama internacional. Particularmente, los **mamíferos silvestres** destacan claramente a lo largo de todo el periodo de estudio. Las dos enfermedades más relevantes fueron la **rabia** y la **TB**, dos enfermedades zoonósicas en las que se invierte un gran esfuerzo internacional para su erradicación. De hecho, la mayoría de los artículos sobre la TB (*i.e.* 80,82%) se han publicado a partir de 2009, lo que demuestra su actual interés. Lo mismo ocurre con la **influenza aviar** y la **EWN** en las **aves**. Además, otra enfermedad que apareció con frecuencia en los artículos fue la **malaria aviar** que amenaza la conservación de muchas especies de aves allá donde estas no están adaptadas al parásito (Martins Braga *et al.*, 2011). Varias de estas enfermedades han sido escogidas como modelo en esta tesis.

Dado que las interacciones en la interfaz HDS se han intensificado en las últimas décadas, principalmente a causa de factores antropogénicos, la **emergencia de enfermedades** se ha visto impulsada (Siembieda *et al.*, 2011). Así pues, se ha reconocido internacionalmente la necesidad de mejorar los sistemas de recogida de datos y los métodos de diagnóstico para los patógenos emergentes adaptados a esta interfaz (Kuiken *et al.*, 2005). Indudablemente, la detección de patologías infecciosas en las poblaciones silvestres, sobre todo en ausencia de la enfermedad en el ganado, debería impulsar la vigilancia activa para definir la naturaleza de la interacción del patógeno con el hospedador silvestre, así como promover la investigación del riesgo potencial de infección de los animales domésticos y los humanos (Mörner *et al.*, 2002). Estas acciones ayudan a distinguir si la enfermedad ha sido introducida recientemente o si bien ya existía pero no había sido descubierta anteriormente, lo que va a definir el tipo de acciones sanitarias a llevar a cabo. Del mismo modo, las nuevas **situaciones de interacción** entre poblaciones silvestres y domésticas favorece la circulación de los patógenos más comunes o incluso endémicos, lo que compromete cualquier actividad de control y erradicación.

5.2 El MDMC como herramienta para la mejora de los sistemas de vigilancia: el caso de la EWN

El valor de los MDMC como herramienta epidemiológica está cada vez más reconocido, sobre todo para el planteamiento de sistemas de vigilancia basados en riesgo (East *et al.*, 2013; Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2013; Sánchez-Matamoros *et al.*, en revisión). Varios autores han destacado la importancia de la publicación presentada en esta tesis (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2012a) y otros artículos similares para conocer la asociación de variables medioambientales con la ocurrencia de brotes, la correlación entre la circulación del VWN entre poblaciones de animales y humanos y, en definitiva, predecir variaciones espaciales en la probabilidad de introducción y difusión de enfermedades emergentes (Barbić *et al.*, 2013; Koopmans, 2013; Chevalier *et al.*, 2014; Valiakos *et al.*, 2014).

La principal ventaja de esta metodología es la gran **flexibilidad** que ofrece, ya que se puede mejorar el nivel predictivo según se aporten datos más precisos, o se puede ampliar su extensión geográfica. De hecho, la aplicación de los MDMC para varias enfermedades en una misma región podría aportar información sobre aquellas zonas y/o periodos de más riesgo, de manera que se podría plantear una **vigilancia activa múltiple y basada en riesgo** (East *et al.*, 2013).

Aun así, el método propuesto para la EWN en Castilla y León presenta algunas limitaciones. La **aplicación de pesos** basado en información bibliográfica y opinión de expertos, aunque aporta un componente de subjetividad al modelo, resulta necesario cuando no existen datos empíricos que lo apoyen (van der Fels-Klerx *et al.*, 2000; Pfeiffer, 2004; East *et al.*, 2013). Para minimizar el sesgo potencial, se puede comprobar cuánto de robusto es el modelo propuesto mediante el **análisis de sensibilidad**.

Además, la precisión de esta metodología se suele hacer mediante la **validación** con brotes reales, lo que permite ajustar el modelo o considerar otros factores no incluidos. En el caso de Castilla y León, al ser una enfermedad exótica, no se dispone de información de brotes para poder validar los mapas. Así pues, convendría revisar esta metodología según se tenga información de mayor calidad, para hacer que la predicción sea lo más precisa posible.

Aparte de los MDMC, en los últimos años se han desarrollado múltiples herramientas epidemiológicas para la EWN. Valiakos *et al*. (2014) revisaron varias **metodologías para determinar las zonas de mayor riesgo** de ocurrencia de brotes, basándose en los factores ambientales y geográficos. Estas metodologías incluyen mapeos de riesgo, modelos de regresión o análisis de *clusters*. A su vez, Chevalier *et al*. (2014) han compilado una lista de las publicaciones destinadas a la **modelización de los procesos implicados en la transmisión del VWN en la cuenca mediterránea**. En concreto, la revisión se centró en la identificación de factores de riesgo de la EWN, la elaboración de mapas de riesgo y la investigación sobre el papel de ciertas especies de vectores y de aves silvestres en la dinámica de la enfermedad (Chevalier *et al*., 2014). Todas estas herramientas proporcionan un conocimiento que puede resultar muy útil no solo para mejorar la adaptación y el desarrollo de metodologías espaciales, sino también para diseñar actividades relacionadas con la vigilancia y la detección precoz. Además, el ECDC ha publicado recientemente una herramienta integral basada en la **evaluación del riesgo**. Este marco de trabajo plantea determinar cuáles son las zonas de mayor riesgo, definir los distintos niveles de riesgo y recomendar las acciones sanitarias más adecuadas para cada situación (ECDC, 2013).

El mapeo de riesgo desarrollado en el presente trabajo, encuadrado en la **revisión del plan de vigilancia y contingencia de la EWN en Castilla y León**, demuestra el interés de la comunidad autónoma por estar preparada para una potencial introducción de la enfermedad. De hecho, ha habido una **actualización del muestreo activo** (JCyL, 2014): en el caso de los équidos, se muestrea un mínimo de 14 caballos por provincia (lo que responde a una prevalencia de diseño del 20% con un intervalo de confianza del 95%). En 2011 se modificaron las zonas en las que se enfocaba el muestreo, ajustando muchas de ellas según el mapa de riesgo de la EWN. En el caso de las aves, el muestreo ha pasado de abarcar 18 animales en 2009 a 1.296 en 2011 (JCyL, 2014). Muchas de estas muestras proceden de explotaciones avícolas y cinegéticas (todas de galliformes), aunque un número relevante corresponde a aves silvestres. Gracias a este método de vigilancia, los sistemas sanitarios de la comunidad están alerta de cualquier incursión de la infección en su territorio, lo que podría tener un grave impacto en équidos y humanos.

5.3 La inmunidad natural frente al VSB como modelo de una enfermedad emergente nueva

La **ESB** es la arbovirosis más recientemente introducida en Europa. Desde su incursión, esta enfermedad ha estado asociada a pérdidas en las explotaciones a causa de la disminución de la producción y del fallo reproductivo (Afonso *et al.*, 2014; Luttikholt *et al.*, 2014; Veldhuis *et al.*, 2014a; Veldhuis *et al.*, 2014b). Sin embargo, el mayor impacto ha estado relacionado con las restricciones comerciales impuestas por terceros países sobre productos animales (EFSA, 2014). Los sectores más afectados en este sentido son los de los rumiantes domésticos, aunque incluso llegó a prohibirse la entrada de productos porcinos en Rusia (FSVPS, 2012). Esta alarma internacional surgió debido a la gran cantidad de incógnitas que presentaba la infección, siendo una de las más destacadas el tipo de inmunidad frente a la misma. Hasta la fecha solo se había publicado acerca de la duración de la inmunidad en el ganado vacuno (Wernike *et al.*, 2013). Así pues, el estudio presentado en esta tesis es el primero que demuestra que **la inmunidad natural de las ovejas frente al VSB puede durar varios meses**. Esta información resulta fundamental para poder controlar los brotes, así como predecir la potencial difusión de los mismos.

A la luz de los resultados presentados, parece que las explotaciones que se han visto afectadas, que pueden llegar a alcanzar seroprevalencias intrarebaño muy altas (Elbers *et al.*, 2012; Méroc *et al.*, 2013), quedarían protegidas frente a futuras reinfecciones, aunque todavía no se ha podido demostrar con total certeza. Como alternativa para conseguir una inmunidad de rebaño eficaz, duradera y homogénea, desde 2013 se dispone de dos **vacunas inactivadas frente al VSB**, Bovilis SBV (MSD Animal Health) y SBVvax (Merial). Estas vacunas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, capaces de frenar la infección, dirigidos frente a las glicoproteínas del VSB (Bréard *et al.*, 2013). Sin embargo, al tratarse de partículas víricas completas, no se puede distinguir un animal infectado de uno vacunado (*i.e.* DIVA) por las técnicas serológicas disponibles, basadas en la nucleoproteína. Por ello, las investigaciones futuras deberían dirigirse al estudio de la eficacia de las vacunas para evitar la entrada de la infección en la explotación, así como el desarrollo de **kits diagnósticos DIVA** basados en otros epitopos víricos.

Hasta la fecha, hay bastante evidencias que indican que los **jejenes del género *Culicoides*** están implicados en la transmisión del virus, principalmente las especies del complejo *Obsoletus* y *C. chiopterus* (revisado en EFSA, 2014). Estas especies no son muy abundantes en el sur de Europa, mientras que *C. imicola* se podría considerar como el mayor representante en estos países. Evidencias obtenidas en Cerdeña (EFSA, 2014) podrían sugerir que *C. imicola* no sea un vector competente para el VSB, lo que explicaría en parte la escasa circulación del virus en los países mediterráneos. De hecho, una situación similar a la ESB ocurrió con el VLA-8, asociado a *C. obsoletus* (Pérez de Diego *et al.*, 2013). Estos hechos tendrían claras ventajas de cara a predecir la difusión de la infección.

Pese a que en un principio las especies afectadas han sido los rumiantes domésticos, la implicación de los jejenes en su transmisión ha reforzado la idea de que puede haber otras **especies de ungulados silvestres implicadas** (Tarlinton *et al.*, 2013). A su vez, por el momento solo se ha demostrado como vía efectiva de transmisión entre animales la **vía vectorial**, con potencial implicación de la **vía venérea** (Hoffmann *et al.*, 2013; Ponsart *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 2014; Steinrigl *et al.*, 2014; Van der Poel *et al.*, 2014), aunque podría haber otras que ayudaran a explicar la difusión sin precedentes que ha tenido esta infección desde su descubrimiento en 2011. Esta **rápida difusión** en la primera temporada parece haber tenido un avance similar tanto en rumiantes domésticos como en silvestres en algunas regiones (Laloy *et al.*, 2014), lo que refuerza la idea de una circulación en ambas poblaciones.

Otra de las teorías que podrían explicar el rápido avance del virus por Europa es que realmente ya estuviera presente desde antes de su descubrimiento, pero que hubiera pasado inadvertido por tratarse de un cuadro clínico inespecífico y suave o por la falta de técnicas diagnósticas adecuadas. De hecho, pese a la emergencia creada en torno al VSB, se ha sugerido que este puede ser ancestro de otro orthobunyavirus descrito desde hace más de 50 años, el virus Shamonda (Goller *et al.*, 2012). Sin embargo, análisis retrospectivos de muestras tanto en animales domésticos como en fauna silvestre rechazan esta teoría, ya que no empieza a haber animales seropositivos hasta 2011 (Chiari *et al.*, 2014; Ganter *et al.*, 2014; Gerhauser *et al.*, 2014; Laloy *et al.*, 2014). Por tanto, el origen del VSB sigue siendo un hecho por resolver. Aun así, controlar esta infección resulta clave para minimizar el impacto económico asociado a los trastornos reproductivos, así como evitar futuras restricciones comerciales como las experimentadas durante 2012-2013.

5.4 El modelo bayesiano como herramienta para la mejora del control de enfermedades: el caso de la tuberculosis en la interfaz HDS

La TB puede ser considerada quizá como el **mejor ejemplo de enfermedad de la interfaz HDS** (Palmer *et al.*, 2012; Gortazar y Cowan, 2013). Las razones que promueven esto son su distribución mundial, la amplia experiencia en su erradicación y la gran cantidad de información científica generada a este respecto. De hecho, cada año aumenta el número de publicaciones acerca de los factores de riesgo y variables relacionadas con la ocurrencia de la TB. Sin embargo, el trabajo presentado en esta tesis (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2012b) es el primero que integra toda esta información y explora la **asociación de la presencia de la TB con variables relacionadas con el ganado doméstico, los reservorios silvestres y el entorno**.

Lo que cada vez resulta más evidente es que para conseguir el éxito en la erradicación de la TB **no se pueden separar la fauna doméstica y la silvestre**. El modelo revela que la prevalencia en jabalíes y ciervos, así como la presencia de explotaciones de vacuno extensivo y toro de lidia, determinan un mayor riesgo del municipio de tener TB en la temporada siguiente. Esto se puede explicar en parte por la **distribución de explotaciones de ganadería y cotos de caza** que existe en la provincia. En concreto, en la provincia de Ciudad Real, la región oriental está destinada fundamentalmente a la producción de bovino en intensivo y al sector ovino, encontrándose a su vez cotos de caza menor (Martínez-López *et al.*, 2013b). Por otro lado, en la mitad occidental y límite sur de la provincia se encuentran las ganaderías de vacuno en extensivo y cotos cinegéticos, favorecidos por el monte mediterráneo (Cristóbal Cotarelo, 2011). De hecho, en esta región existen zonas evidentes de **contacto** entre ganaderías y cotos, **solapamiento** (Figura 11), e incluso es característica la **coexistencia de ambas actividades** en la misma finca, lo que fomenta el uso compartido de recursos y facilita la transmisión de *M. bovis* (Kukielka *et al.*, 2013).

En concreto, se ha comprobado que la asociación que existe entre el ganado y los reservorios silvestres en esta provincia favorece no solo la **ocurrencia** de la TB, sino también la **persistencia** y la **incidencia** de la enfermedad en Ciudad Real (Martínez-López *et al.*, 2013b).

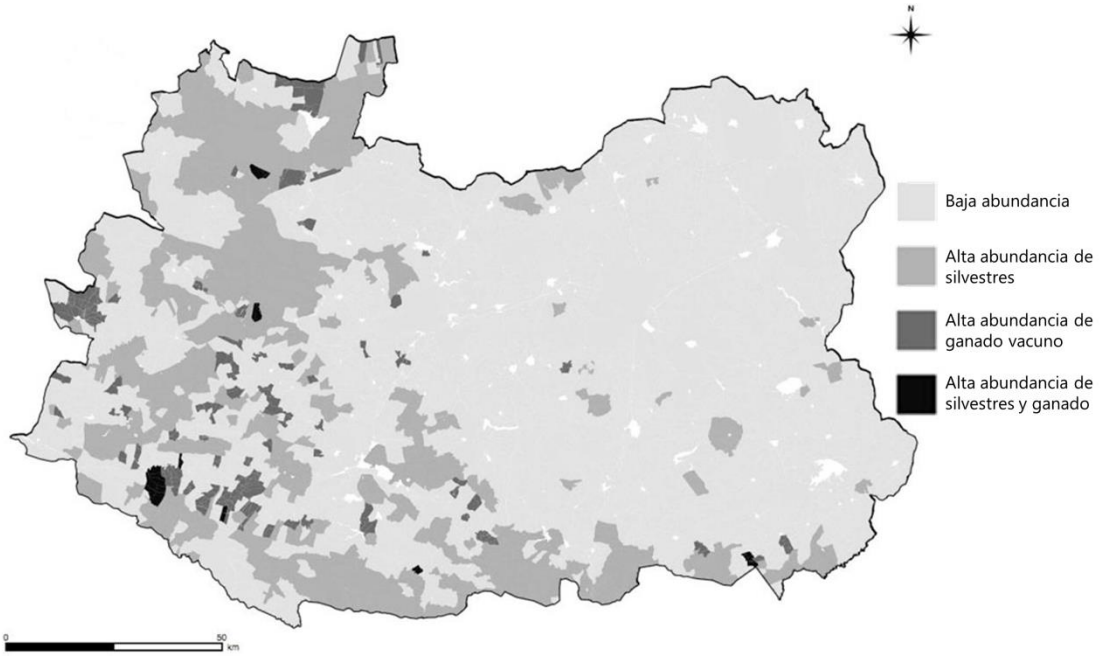


Figura 11. Escenarios epidemiológicos para la tuberculosis bovina en Ciudad Real basados en la abundancia de ganado vacuno y ungulados silvestres (*i.e.* jabalí y ciervo) [Fuente: adaptación de Cristóbal Cotarelo, 2011].

En un estudio realizado a nivel europeo, se ha visto que el estatus de la TB en España se encuentra afectado por el **sistema multihospedador ganado vacuno-jabalí-ciervo**, al igual que ciertas regiones de Portugal, Hungría, Francia y Bélgica (Hardstaff *et al.*, 2013). Además, queda patente que la amenaza de la TB en el sector bovino está determinada tanto por la abundancia, solapamiento espacial y prevalencia de las especies silvestres como por la del propio ganado vacuno (Hardstaff *et al.*, 2013). Esto sugiere de nuevo que la lucha frente a la TB debe comprender actividades en los reservorios silvestres más importantes, sin descuidar los estrictos controles en el ganado.

De hecho, el modelo destaca la utilidad de las **actividades de inspección veterinaria de los animales abatidos**. Esta herramienta resulta valiosa para la toma de muestras, el registro de frecuencias de infecciones y el seguimiento de los resultados de caza (Armenteros *et al.*, 2013). Asimismo, la **intensidad del muestreo de TB en el ganado vacuno** (*i.e.* número de animales muestreados en cada municipio) también se asocia con la ocurrencia de TB en la región. La importancia de este factor radica en que haya una mayor probabilidad de detección de *M. bovis* en explotaciones grandes o de tener algún reactor falso positivo (Martínez-López *et al.*, 2013b).

Por el contrario, en el modelo presentado los **movimientos de ganado** no han sido destacados como factores de riesgo. Una razón que explica la ausencia de este factor es que la unidad espacial escogida es el municipio, por lo que no se ha podido evaluar individualmente cada explotación. En cambio, otros estudios, tanto en Europa como en la región de estudio, han identificado que los movimientos influyen en la ocurrencia o incidencia de la TB (Gopal *et al.*, 2006; Humblet *et al.*, 2010; Probst *et al.*, 2011; Dommergues *et al.*, 2012; Hardstaff *et al.*, 2013; Martínez-López *et al.*, 2013b). Tanto es así que actualmente el plan de erradicación nacional de TB contempla la vigilancia de los movimientos de salida de ganado vacuno (RASVE, 2014b).

Asimismo, se ha indicado el papel de **otras especies domésticas** no incluidas en el modelo bayesiano. En España, pese a ver con frecuencia lesiones tuberculosas en las canales de **cerdo** (Hardstaff *et al.*, 2013) su papel como reservorio no queda totalmente claro (Gortazar *et al.*, 2011; Di Marco *et al.*, 2012). Además, mientras que las **ovejas** parece que ofrecen cierta resistencia a la infección, las **cabras** pueden actuar como reservorio (revisado en Martínez-López *et al.*, 2013b). Este hecho queda también cubierto por el plan nacional de erradicación, en el que se indica el muestreo obligatorio de los rebaños de cabras que comparten pastos con vacuno (RASVE, 2014b). Dado que la distribución de estas especies en Ciudad Real coincide con las áreas de solapamiento entre ganado vacuno y fauna silvestre, convendría estudiar el papel que pueden jugar en el mantenimiento de la TB en la interfaz.

Pese a la inclusión de **variables medioambientales** en el modelo, ninguna fue considerada como factor de riesgo en el modelo final. Las micobacterias tienen una pared rica en lípidos que facilita su **supervivencia en el medioambiente**, favoreciendo la exposición del ganado y la fauna silvestre al patógeno (Fine *et al.*, 2011). Además, en un estudio realizado en la región centro-sur de España, se observó que la **interacción** entre el ganado y los animales silvestres suele ser de tipo de **indirecto** y, principalmente, en **puntos de agua** (Kukielka *et al.*, 2013). Por ello, convendría estudiar en trabajos futuros el efecto que ciertas variables como la humedad, el pH, la acumulación de agua o el tipo de suelo (Walter *et al.*, 2014) tienen en la circulación y persistencia de *M. bovis* en esta región, para, de este modo, orientar las medidas de control en las zonas más óptimas para que se produzca la transmisión.

En conclusión, son muchos los **factores que influyen en la ocurrencia, incidencia y persistencia de la TB**. Sin embargo, Allepuz *et al.* (2011) agrupan estos factores en dos tipos: los **factores puntuales** (como las variaciones en las actividades de vigilancia, las técnicas diagnósticas empleadas o las actividades de inspección) y los **factores constantes** (como el contacto con reservorios silvestres o el tamaño de la explotación). Son precisamente estos segundos los que tienen una mayor importancia en regiones como Ciudad Real, en las que resulta difícil bajar la prevalencia pese a los esfuerzos sanitarios. Por ello resulta vital conocer cuáles de los factores que operan en la interfaz son los de mayor riesgo y cómo se pueden controlar. No hay que olvidar que el **propósito final del control de la TB en la fauna silvestre en España** es evitar la transmisión al ganado vacuno y a los humanos (Gortazar *et al.*, 2011). Por tanto, los resultados ofrecidos por el modelo bayesiano permiten optimizar los recursos sanitarios en aquellas áreas en las que la situación resulta más conflictiva, que se concentran principalmente en la región sudoeste de la provincia.

5.5 Herramientas diagnósticas para virus compartidos entre animales domésticos y silvestres

Dada la falta de técnicas adaptadas a fauna silvestre, normalmente se tiene que recurrir a kits diseñados para su uso en animales domésticos. Por ello, el éxito diagnóstico va a depender del **buen diseño del protocolo de detección** de patógenos en muestras de animales silvestres. Por otro lado, la **calidad de las muestras** supone un reto importante cuando se utilizan muestras procedentes de animales silvestres. Por ejemplo, el lapso de tiempo entre que se caza al animal y se tiene acceso a la recogida de muestras sanguíneas hace que muchas veces estas se encuentren **hemolizadas**. Además, recoger las muestras en condiciones no estériles puede suponer problemas de **contaminación bacteriana** y **citotoxicidad**. Ya se ha anotado con anterioridad que estos factores pueden tener un efecto negativo sobre la precisión diagnóstica (Boadella y Gortázar, 2011; Laloy *et al.*, 2014). Por ello, se deberían descartar las muestras que se encuentren en un peor estado, así como interpretar los resultados con cautela.

Para estudiar las muestras de jabalíes y ciervos frente a los virus del SRRP y de la DVB, se utilizaron técnicas serológicas y virológicas. En el caso del VSRRP, se utilizó un **kit indirecto usado ampliamente en estudios de jabalíes** (Zupancic *et al.*, 2002; Vengust *et al.*, 2006; Montagnaro *et al.*, 2010; Hälli *et al.*, 2012). En este caso hay que considerar que el jabalí y el cerdo doméstico, pese a sus notables diferencias, se incluyen dentro de la misma especie (*i.e. Sus scrofa*) por lo que es de esperar que la homología de sus anticuerpos sea bastante alta, lo que hace posible utilizar los kits diagnósticos de cerdos en jabalí sin provocar disrupciones importantes en el resultado (ver Rodríguez-Prieto *et al.*, 2013a), aunque debe ser validado en cada caso. En cambio, este problema de falta de especificidad puede ocurrir en el caso de los rumiantes silvestres. En el caso del VDVB, se planteó la utilización de un kit de ELISA indirecto para el *screening* de las muestras, con la consecutiva aplicación de un kit de **ELISA de competición** como test de confirmación. Aunque la seroneutralización habría sido altamente útil, el protocolo de detección empleado está recomendado para la detección de animales silvestres seropositivos (Frölich *et al.*, 2012). Algo similar ocurre con el VSB, demostrando que la seroneutralización es la técnica más específica, aunque el ELISA de competición resultaría la técnica de elección para analizar muestras de ciervo frente al VSB (Laloy *et al.*, 2014).

En cuanto a la detección de los virus, se ha empleado la RT-PCR en tiempo real. Esta técnica no conlleva ninguna limitación en cuanto a las especies en las que se esté detectando el virus, ya que su diana es el genoma vírico. Sin embargo, la calidad de la muestra puede comprometer la sensibilidad y la especificidad de las técnicas. Un primer aspecto para solventar este problema es utilizar *primers* diseñados para la amplificación de **regiones altamente conservadas de los virus**. En este sentido, para el VSRRP, se escogieron *primers* de las regiones ORF1 y ORF7; para el VDVB, los *primers* empleados estaban dirigidos a la región no transcribible 5' (*5'-UTR*), diana de la mayoría de las PCRs de detección de los pestivirus (revisado en Hoffmann *et al.*, 2006). A su vez, el **empleo de genes *housekeeping*** (*i.e.* proteína ribosomal S20 para las muestras de jabalíes y β-actina para las muestras de ciervo) garantizan la integridad del ARN presente en las muestras, potencialmente los del VSRRP y el VDVB en cada caso (Hüssy *et al.*, 2001; Oleksiewicz *et al.*, 2001; Korimbocus *et al.*, 2002; Kim y Dubovi, 2003; Wang *et al.*, 2011).

Para poder garantizar los resultados de laboratorio, conviene disponer de **técnicas *gold standard***. Estas técnicas permiten asegurar el resultado diagnóstico, particularmente en el caso de agentes patógenos con alta variabilidad, como son el VDVB o el VSRRP. Sobre todo en el caso del VDVB, habría sido altamente recomendable realizar seroneutralización con las muestras (Kirchgessner *et al.*, 2013) para descartar que los sueros que estaban reaccionando no fueran específicos de otras pestivirosis, como la enfermedad de Border. Sin embargo, la prevalencia aparente del VDVB obtenido por la RT-PCR Taqman, que es muy específica, apoya el resultado de la serología.

Por último, la **secuenciación** y la **realización de análisis filogenéticos** son de gran utilidad en este tipo de estudios, ya que permiten no solo garantizar que los resultados de la RT-PCR son adecuados, sino también poder relacionar las secuencias encontradas con otras publicadas hasta la fecha y establecer potenciales relaciones de transmisión entre los individuos analizados, así como orientar el origen del contagio. De hecho, gracias al árbol filogenético obtenido con las secuencias del VDVB, se ha sugerido que este pueda estar circulando tanto entre las poblaciones de ciervos como en la interfaz DS.

5.6 Valor de la termografía como herramienta diagnóstica en fauna silvestre

Definir el patrón térmico de cada especie es el primer punto para poder plantear un diagnóstico mediante **termografía infrarroja**, ya que hay que **distinguir "lo fisiológico" de "lo patológico"**. De hecho, esta fue la razón de seleccionar las morsas para su estudio. Al hacer un chequeo termográfico de especies incluidas en la colección del Oceanogràfic, se identificó un patrón peculiar en las morsas, con la aparición de puntos pequeños de mayor temperatura distribuidos por la superficie corporal (Figura 12).

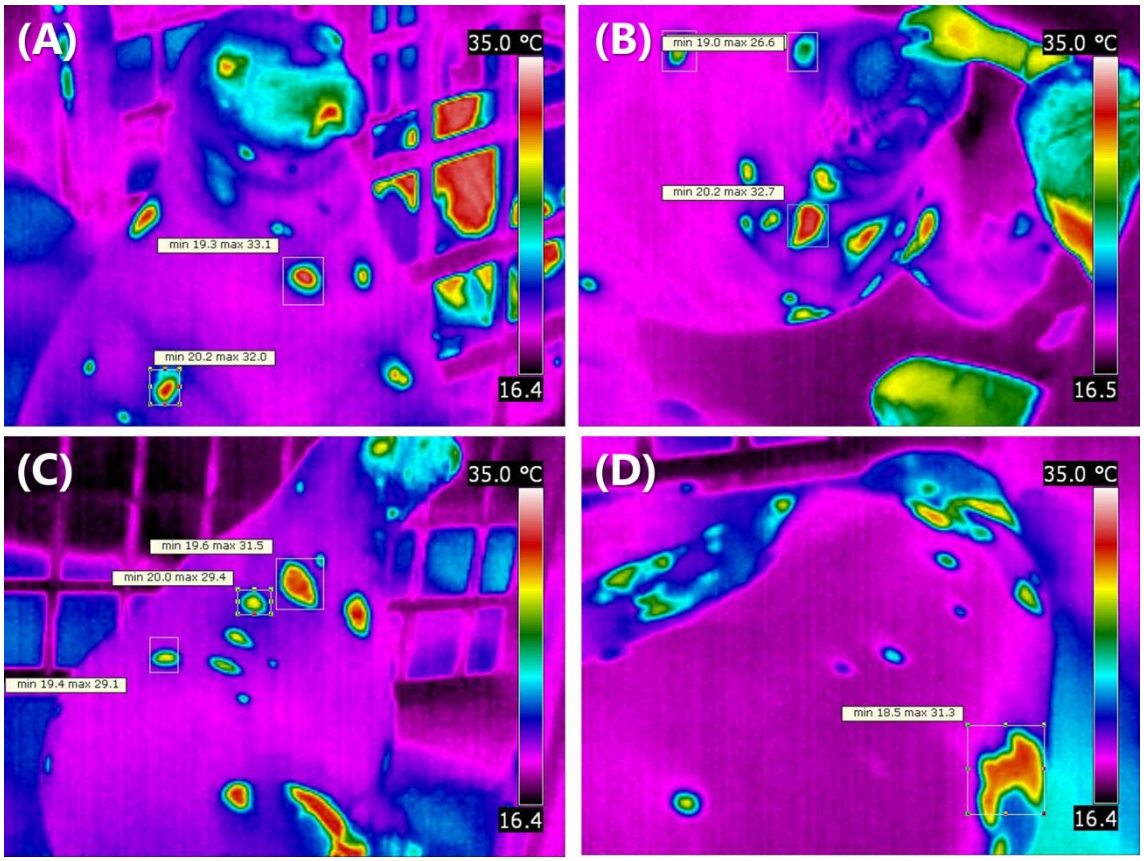


Figura 12. Termogramas que muestran la aparición de ventanas térmicas en distintos individuos de morsas del Pacífico (*Odobenus rosmarus divergens*) tras salir del agua. (A) Cabeza y tercio anterior. (B) Cabeza y tercio anterior, con el entrenador. (C) Flanco derecho. (D) Tercio posterior y aleta posterior derecha [Fuente: imágenes propias].

Dado el comportamiento natural de las morsas, en un principio se pensó que este patrón podía corresponder a pequeñas inflamaciones causadas al golpearse entre ellas. Sin embargo, la realización de las sesiones termográficas y el análisis pormenorizado de los termogramas permitieron describir el **patrón termorregulatorio** de estos animales.

Este patrón resulta similar al descrito en otras especies de pinnípedos, en concreto fócidos (Mauck *et al.*, 2003). Sin embargo, gracias a una sesión realizada en el Oceanogràfic con focas comunes (*Phoca vitulina*) se pudieron apreciar varias diferencias, tales como un menor número de ventanas térmicas o un desarrollo mucho más rápido que el de las morsas (Figura 13, Rodríguez-Prieto *et al.*, 2013b).

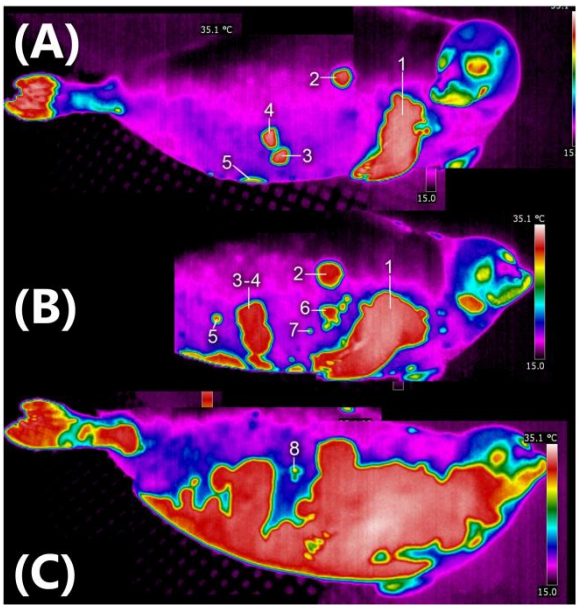


Figura 13. Composición de termogramas de un individuo de foca común (*Phoca vitulina*) durante una sesión termográfica. (A) A los 3 minutos de haber salido del agua. (B) A los 5-6 minutos. (C) A los 8-9 minutos [Fuente: imágenes propias].

Esto demuestra que el **estudio del patrón térmico** de cualquier especie silvestre debe preceder a la aplicación de la termografía con fines diagnósticos. Aun así, la termografía infrarroja ha demostrado su gran utilidad desde hace décadas. En el ámbito veterinario, se ha descrito su aplicación para el diagnóstico de patologías locomotoras en caballos (Turner, 1991), la evaluación de la fertilidad de huevos en aves (Melero *et al.*, 2009), la detección de fiebre en vacas afectadas con el síndrome respiratorio bovino (Schaefer *et al.*, 2007) u ovejas afectadas por el VLA (Pérez de Diego, 2012), entre otras. Esta última aplicación destaca la utilización potencial de la termografía tanto en granjas centinelas como en poblaciones silvestres para la **detección de animales febriles**, con el objetivo de enfocar y dirigir en tiempo real las acciones sanitarias (p.ej. captura, muestreo, sacrificio, etc.) sobre esos animales, ya que son los que probablemente resulten de mayor interés epidemiológico, sin tener que provocar el estrés de la manipulación previa.

5.7 Implicación de la fauna silvestre en las enfermedades seleccionadas y en su gestión sanitaria

En esta tesis se han tratado cinco enfermedades de la interfaz HDS. Cada una responde a un tipo de características propias, aunque en conjunto representan a muchas otras enfermedades a las que podrían extrapolarse sus conclusiones. Como representantes de las **enfermedades emergentes vectoriales** se han utilizado la EWN y la ESB, mientras que el SRRP, la DVB y la TB han sido elegidas como **enfermedades presentes (incluso endémicas)** en la región de estudio. De estas, la EWN y la TB son, además, **enfermedades zoonósicas**.

En la última década **varios linajes del VWN** han estado circulando en Europa, observándose de hecho una recrudescencia de los brotes desde 2010. En los últimos cuatro años, se han visto afectados 26 países europeos y del entorno mediterráneo (Figura 14, Tabla 6). En la cuenca mediterránea se ha observado la **circulación simultánea de los linajes 1 y 2**, incluso coincidiendo en las mismas áreas (Savini *et al.*, 2012). Normalmente agosto y septiembre se constituían como los meses de mayor abundancia de mosquitos, por lo que se asociaba a un mayor riesgo de ocurrencia de brotes. Sin embargo, la aparición de los primeros brotes de la temporada cada vez se adelanta más, declarándose los primeros casos incluso en julio (Barzon *et al.*, 2012).

Desde 2010 se han notificado con más frecuencia brotes en humanos y équidos (Tabla 6). Sin embargo, para que el VWN se establezca en este ciclo urbano, ha tenido que circular previamente entre mosquitos y aves silvestres (*i.e.* ciclo selvático) para poder llegar al nivel suficiente de mosquitos infectados para que se produzcan estos brotes (Jiménez-Clavero, 2012). Sin embargo, en la Tabla 6 se observa que la detección de casos suele ocurrir después de la detección de la enfermedad en équidos y/o humanos, o en el mejor de los casos a la vez. Esto sugiere que las actividades para la detección de la infección en fauna silvestre o bien son deficitarias o bien no son lo suficientemente eficientes. Por ello, se destaca la necesidad de **desarrollar actividades de vigilancia en la fauna silvestre**, ya que suponen un buen marcador para la detección precoz de la infección (Figura 7) (O'Leary *et al.*, 2004; Nemeth *et al.*, 2007).

Tabla 6. Países europeos y del entorno mediterráneo afectados por la enfermedad de West Nile en el periodo 2010-2013. Se muestran por colores los años en los que se han notificado casos en humanos (en rojo), équidos (en morado) y fauna silvestre (fundamentalmente aves, en verde). Se indican con un asterisco las sospechas de infección (*i.e.* sin confirmación) [Fuente: elaboración propia con datos del ECDC y WAHID-OIE; última actualización: 23 de julio de 2014].

País	2010	2011	2012	2013	País de U.E.	Entorno mediterráneo
Austria					√	
España					√	√
Grecia					√	√
Hungría					√	
Italia					√	√
Macedonia		*				√
Rumanía					√	
Rusia	*	*	*	*		
Turquía						√
Bulgaria					√	
Chipre					√	√
Israel						√
Marruecos						√
Portugal					√	√
Túnez	* *	* *		*		√
Ucrania						
Albania		*	*	*		√
Serbia						√
Argelia						√
Croacia					√	√
Kosovo						√
Montenegro						√
Palestina						√
Bosnia y Her.						√
Eslovenia					√	√
Rep. Checa					√	

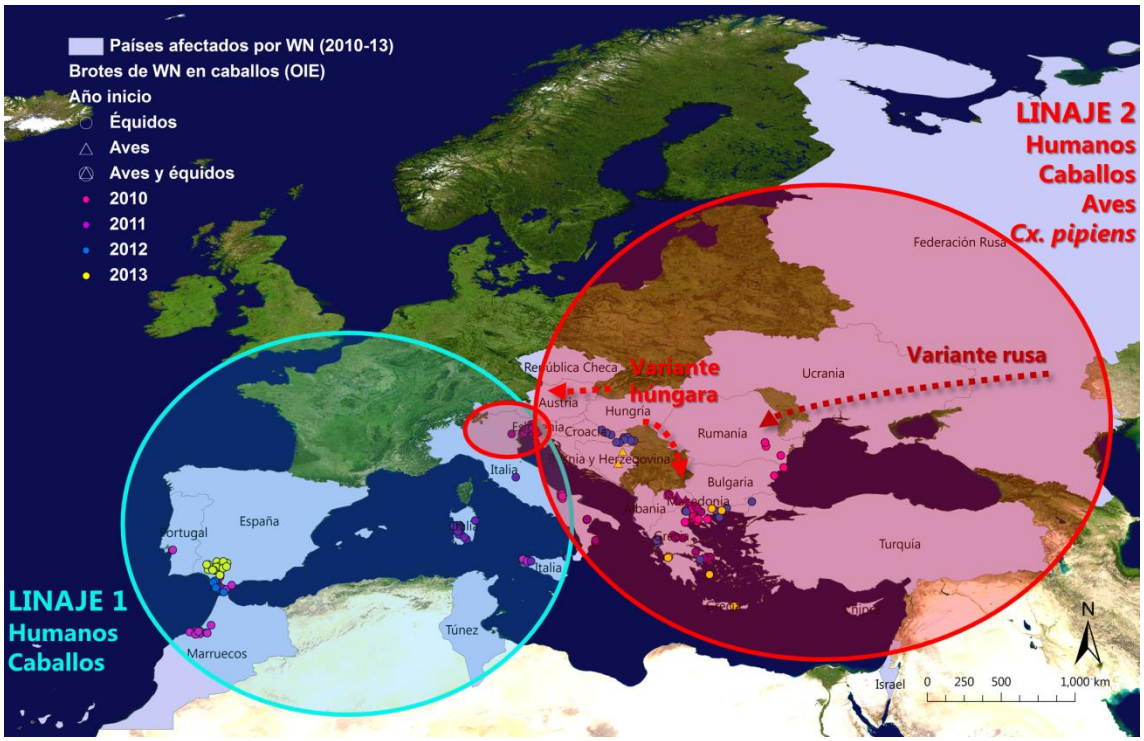


Figura 14. Mapa de países afectados en Europa y la cuenca mediterránea en el periodo 2010-2013 por brotes de los linajes 1 y 2 del virus de West Nile [Fuente: elaboración propia con datos de ECDC y WAHID-OIE; última actualización: 23 de julio de 2014].

Se ha detectado la infección con el VWN en numerosas especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Marra *et al.*, 2004). Sin embargo, las **aves silvestres** son las más relevantes de cara a la detección precoz, no solo por la gran cantidad de especies que se pueden infectar, sino por la capacidad de amplificación del virus de muchas de ellas y su más que demostrada implicación en el ciclo epidemiológico que afecta a équidos y humanos (Marra *et al.*, 2004; Nemeth *et al.*, 2007). Para ello, es necesario conocer cuáles son estas especies para cada región, cómo están distribuidas y cuál es su carácter (*i.e.* si son migratorias o residentes). Sin embargo, el muestreo en aves resulta costoso. Por un lado, la toma de muestras en las aves puede ser altamente estresante (ocasionando incluso la muerte del animal), y los volúmenes que se pueden obtener son muy limitados (Sheldon *et al.*, 2008; Owen, 2011). Por otro lado, cuando se muestrea un ave de una especie no residente, es difícil determinar si está o no de paso en el lugar de recogida (Webster *et al.*, 2002). Asimismo, plantear muestreos basados en la captura-recaptura de individuos, con el fin de trazar potenciales orígenes de la infección o la seroconversión de una temporada a otra, resulta normalmente complicado y costoso.

Recientemente se ha sugerido el papel de ciertas especies de **mamíferos como centinelas** de la enfermedad, como el jabalí, el ciervo, el zorro o incluso el cerdo ibérico (Boadella *et al.*, 2012a; Gutiérrez-Guzmán *et al.*, 2012). La monitorización en el jabalí y el ciervo solventa muchas de las limitaciones que presentan las aves (Boadella *et al.*, 2012a) ya que son especies cinegéticas de las que se pueden obtener grandes cantidades de suero fácilmente. Además, enfocar el muestreo a individuos jóvenes permitiría reconocer que la infección ha sido reciente. La detección de la infección por el VWN en estos hospedadores implicaría a su vez la transmisión del virus fuera del ciclo selvático y, al tener una movilidad mucho menor, ayudan a determinar potenciales áreas de circulación del virus. En cualquier caso, conviene contar con **sistemas de detección precoz eficaces** frente a este patógeno, ya que supone un riesgo no solo para las explotaciones equinas, sino también para la salud pública. Además, el **avance del linaje 2** hacia la región occidental de Europa pone de manifiesto la necesidad de preparación de España, ya que la cocirculación de ambos linajes crea un escenario de consecuencias impredecibles.

A su vez, la exposición de la fauna silvestre a la **infección por el VSB** ha quedado demostrada por la detección de anticuerpos en varias especies de animales silvestres y de zoológico (revisado en EFSA, 2014). Sin embargo, no se conoce si estas especies han estado involucradas en la rápida difusión del virus por Europa o si podrían tener un papel en el ciclo de transmisión, incluso favoreciendo que la enfermedad se convierta en endémica de la enfermedad en ciertas zonas (Tarlinton *et al.*, 2013). Hasta la fecha, solo se ha podido encontrar ARN vírico en una cría de alce en Polonia (Larska *et al.*, 2013). Este hallazgo no implica que la especie tenga un papel importante en la transmisión, ya que, al ser una enfermedad vectorial, se requiere una viremia mínima para que los jejenes adquieran el virus al alimentarse del animal infectado. A su vez, la ocurrencia de abortos o fetos con malformaciones congénitas en ungulados silvestres podría ser indicativa de la ESB; sin embargo, su detección no resulta factible en la práctica, debido al amplio rango de hábitat y a la acción de animales carroñeros (Tarlinton *et al.*, 2013). Así pues, convendría ampliar la información existente para saber qué especies silvestres podrían actuar como **reservorio de la infección**, ya que sería un determinante de reemergencia, como se ha especulado para el VLA (Ruiz-Fons *et al.*, 2014).

En cuanto al **VSRRP**, los resultados obtenidos sugieren que este virus no resulta útil como **marcador sanitario del contacto entre jabalíes y cerdos ibéricos**, ya que la seroprevalencia obtenida en ambos fue muy baja, y no se detectó el virus en ninguna de las muestras del estudio. Estos resultados son similares a otros estudios llevados a cabo en la zona y en regiones similares (ver Rodríguez-Prieto *et al.*., 2013). De esta forma, en contexto con otras investigaciones similares, se sugiere que el papel del jabalí como reservorio del VSRRP es limitado. Esta consideración supone una ventaja de cara a la erradicación de la enfermedad, además de que limita el riesgo al que las explotaciones en extensivo están expuestas.

Del mismo modo, no se pudo detectar el **VDVB** en ninguna de las muestras de jabalí analizadas, incluso procediendo de cotos cercanos a zonas en las que se había registrado circulación del virus en ciervos y vacas. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de otros patógenos circulando de manera más activa en el jabalí, como el **circovirus porcino tipo 2 (CVP2)**, **el virus de la hepatitis E (VHE)** o el agente causal del mal rojo, ***Erysipelothrix rhusiopathiae*** (Boadella *et al.*, 2012b). Un estudio reciente ha detectado seroprevalencias relativamente altas frente al **VHE** en poblaciones cercanas de jabalí, ciervo y cerdo ibérico en Ciudad Real (Kukielka *et al.*, en revisión). Por otro lado, la infección por el **CVP2** en jabalíes está ampliamente distribuida por nuestro país (Vicente *et al.*, 2004) la cual se ha visto incrementada en los últimos años, sobre todo en cotos vallados (Boadella *et al.*, 2012b). Además, la depleción linfoide que ocasiona esta infección puede favorecer la concomitancia de otros patógenos en el animal, como *M. bovis* (Risco *et al.*, 2013; Díez-Delgado *et al.*, 2014). Así pues, cualquiera de estos agentes sería de elección de cara a poder estudiar la transmisión de patógenos en la interfaz jabalí-cerdo doméstico.

En el caso de los **rumiantes**, el **VDVB** sí que parece un **buen candidato como marcador de contacto**, aunque no existe mucha información de la implicación de la enfermedad en cérvidos (Frölich *et al.*, 2012). Las tasas de prevalencia y seroprevalencia encontradas, junto con la configuración de los árboles filogenéticos, apuntan a que este virus ha estado circulando en la interfaz durante cierto tiempo. El análisis filogenético sugiere que pueda haber cepas propias de los animales silvestres, como se ha apuntado en otros estudios (Frölich y Hofmann, 1995; Lillehaug *et al.*, 2003; Casaubon *et al.*, 2012).

La circulación independiente dentro de las poblaciones de ciervo resulta un hecho factible, tal y como se ha observado en otros estudios (Elazhary *et al.*, 1981; Frölich, 1995). Se ha destacado además que la abundancia de ciervo determina el riesgo de infección para el ganado. A su vez, en otras regiones se ha sugerido que el ganado vacuno es la fuente de infección para los animales silvestres, en concreto los individuos persistentemente infectados (Glawischnig *et al.*, 2010). El estudio presentado en esta tesis plantea un buen punto de partida para continuar la investigación de esta enfermedad, en la que parece que los determinantes propios de la región favorecen su circulación dentro de las poblaciones silvestres y entre estas y el ganado. La determinación del **papel del ciervo como reservorio** resulta clave para poder definir estrategias de gestión sanitaria eficaces en el ganado vacuno. Por ello, se deberían plantear estudios para profundizar en la patogenia, inmunología y epidemiología de esta enfermedad en la interfaz ciervo-ganado vacuno.

Por otro lado, según todo lo visto anteriormente, la **TB** se constituye como un excelente **marcador del contacto entre ungulados silvestres y domésticos**, principalmente entre ganado bovino, jabalíes y ciervos. En España, el **jabalí** se ha posicionado como el reservorio silvestre principal (Gortázar *et al.*, 2011) y el mejor objetivo de las acciones de monitorización y vigilancia (Boadella *et al.*, 2011) por su amplia distribución y abundancia, las altas tasas de prevalencia y la presentación generalizada de lesiones tuberculosas en los animales infectados (Fitzgerald y Kaneene, 2013). Tal es la situación que se ha sugerido que *M. bovis* es capaz de circular y persistir en **poblaciones de jabalí con sobreabundancia aún en ausencia de ganado** (Gortazar *et al.*, 2005), situación parecida al VDVB en ciervos. Un estudio reflejó la relevancia de las interacciones entre los reservorios de TB en el centro-sur de la Península, mediante el muestreo de más de 2.000 ciervos y jabalíes abatidos en 1999-2004 (Vicente *et al.*, 2006). Mientras que el 84% de las poblaciones resultaron positivas a TB en áreas donde ambas especies coexisten, en aquellas donde solo habita el jabalí la prevalencia era del 75%. En algunas poblaciones de jabalí, la prevalencia registrada alcanzó el 100%. Asimismo, las mayores prevalencias en cérvidos se han registrado en circunstancias en las que hay una alta densidad de animales, ya sea por causas naturales o antropogénicas (revisado en Gortázar et al., 2006).

Dadas las múltiples evidencias de circulación de *M. bovis* en las poblaciones silvestres y la variedad de rutas de transmisión, se ha sugerido la posibilidad de que la transmisión se produzca de los reservorios silvestres al ganado. En cambio, en zonas como la región centro-sur de España, en las que, además, muchas explotaciones son consideradas persistentemente infectadas, la transmisión podría ser bidireccional. De hecho, en Cataluña, el espoligotipado de muestras de jabalíes y vacas en cercanía apunta a que el ganado es la fuente original de la infección para los jabalíes (Mentaberre *et al.*, 2014).

5.8 Perspectivas y líneas de futuro

En la presente tesis doctoral se ha puesto de manifiesto la importancia de mantener la **sanidad de la fauna silvestre**, no solo por su valor en la biodiversidad, sino para proteger la sanidad del ganado doméstico, la seguridad alimentaria y la salud pública. Dentro de este enfoque, se han desarrollado y aplicado **herramientas epidemiológicas y diagnósticas**, cuyos resultados pueden integrarse en **programas de gestión sanitaria de la fauna silvestre**. Asimismo, se han querido tratar desde una **perspectiva horizontal** varios aspectos acerca de las **enfermedades de la interfaz HDS**, por la relevancia que estas tienen sobre los humanos y los animales domésticos. No obstante, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de seguir profundizando en esta dirección.

La vigilancia de enfermedades en fauna silvestre debe enfocarse en los **hospedadores silvestres más adecuados**, para lo cual hay que considerar su distribución, abundancia, grado de protección, prevalencia y susceptibilidad hacia la enfermedad de interés, facilidad de acceso a muestras y capacidad diagnóstica (*i.e.* adaptación de pruebas diagnósticas para la especie silvestre en cuestión) (Boadella *et al.*, 2011). De hecho, se deberá estudiar la adecuación de estas medidas en cada región, ya que pueden existir **variaciones ecológicas y regionales** que determinen el papel epidemiológico que juega la especie (Hardstaff *et al.*, 2013). Por ejemplo, mientras que en España el jabalí se considera el principal reservorio silvestre de la TB (Fitzgerald y Kaneene, 2013), en la zona noroeste de Italia se comporta más como un hospedador *spillover* (Dondo *et al.*, 2007).

Se requiere un **conocimiento extenso sobre la ecología** tanto de los patógenos como de las poblaciones humanas y los animales domésticos y silvestres para poder controlar de manera eficaz las enfermedades de la interfaz HDS (Woodford, 2009; Boadella *et al.*, 2011). Mejorar el conocimiento acerca de las causas naturales y antropogénicas que condicionan los contactos en la interfaz HDS resulta crucial para limitar la transmisión de patógenos (Miller *et al.*, 2013). Dada la naturaleza multidireccional de esta transmisión, queda una vez más patente la necesidad de colaboración multidisciplinar si se pretende desarrollar una gestión sanitaria eficaz y duradera.

Por otro lado, los estudios de patógenos y anticuerpos suponen un buen punto de partida, pero deben complementarse con **estudios experimentales** de transmisión, patogenia y susceptibilidad para determinar la importancia de la infección en la fauna silvestre. A su vez, uno de los mayores retos del estudio de las enfermedades infecciosas compartidas es determinar la **direccionalidad de la transmisión**, ya que es determinante fundamental y garantía de éxito de cualquier acción sanitaria de la interfaz HDS.

Todos estos aspectos plantean tan solo algunas de las innumerables incógnitas que quedan por caracterizar dentro del mundo de la epidemiología de la fauna silvestre. En esta tesis doctoral se han tratado de dar respuestas a varios aspectos de enfermedades infecciosas que podrían ser tratadas como marcadores de interacción. A la vez, se han dejado muchas puertas abiertas para futuros estudios.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA

Hay un interés creciente en la investigación sobre enfermedades infecciosas y la fauna silvestre, como se demuestra por el incremento en el número de publicaciones científicas relacionadas con el tema, sobre todo a partir de 2009 (un 72,92% de las mismas se han publicado entre 2009 y 2014). En concreto, las publicaciones sobre mamíferos, aves y peces han destacado sobre las demás, tratando sobre varias enfermedades tanto endémicas como emergentes.

FIRST

There is an increasing interest in research on infectious diseases of wildlife, as shown by the increase in the number of scientific publications related to the topic, especially since 2009 (72.92% of the articles have been published from 2009 to 2014). Particularly, publications on mammals, birds and fish are highlighted among the rest, dealing with several diseases, both endemic and emerging.

SEGUNDA

En todas las provincias de Castilla y León se han detectado zonas de mayor probabilidad de ocurrencia de la EWN, siendo julio y agosto los meses de mayor riesgo de ocurrencia de brotes. Estos datos han permitido plantear mejoras en los sistemas de vigilancia frente a la EWN basados en riesgo de esta comunidad autónoma.

SECOND

In all provinces of Castile and León, areas of high suitability for West Nile Fever (WNF) occurrence have been detected, being July and August the most suitable months for outbreak occurrence. These results have allowed to suggest improvements to the risk-based surveillance system for WNF in the Autonomous Community.

TERCERA

Se ha demostrado que la infección natural con el VSB en ovejas induce una respuesta inmune eficaz frente al desafío experimental con el virus, con una duración mínima de tres meses. A su vez, la transferencia de anticuerpos de las ovejas a sus corderos frena igualmente la infección de los mismos al menos durante un mes y medio tras la ingesta de calostro.

THIRD

It has been shown that the natural infection of ewes with the Schmallenberg virus induces an effective immune response against the experimental challenge with the virus, which lasts at least three months. In addition, antibody transfer from ewes to their lambs also stops the infection of lambs at least for one month and a half after the colostrum intake.

CUARTA

Se ha observado un *cluster* de TB en la región occidental de Ciudad Real que podría estar asociado a distintos factores de riesgo: la persistencia, incidencia y muestreo de la TB en vacuno, la prevalencia en jabalíes y ciervos, la intensidad de inspección en eventos cinegéticos y la presencia de explotaciones de vacuno de carácter extensivo. La incorporación de estos factores de riesgo en los programas de control de la TB podría ser de gran utilidad para disminuir la circulación de *M. bovis* en la interfaz DS de la región.

FOURTH

A cluster of bovine tuberculosis (BT) has been observed in the western region of Ciudad Real, which could be associated with different risk factors: the persistence, incidence and sampling of BT in cattle, the prevalence in wild boar and red deer, the intensity of inspection of hunting events and the presence of extensive cattle farms. The inclusion of these risk factors in BT control programs could be greatly useful to decrease Mycobacterium bovis *circulation in the domestic-wildlife interface of the region.*

QUINTA

Se ha determinado que el jabalí no juega un papel relevante en la epidemiología del SRRP dadas las bajas seroprevalencias frente al virus en las poblaciones analizadas (en concreto, un 2,4% en jabalíes y un 1,25% en cerdos ibéricos) y la ausencia de resultados positivos en las RT-PCRs utilizadas. Por otro lado, los datos del análisis espacial sugieren que la infección de SRRP en jabalíes en Europa está influida por la densidad de porcino doméstico en zonas cercanas.

FIFTH

It has been determined that wild boar does not play a significant role in the epidemiology of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) due to the low seroprevalences against the virus in the studied populations (specifically, 2.4% in wild boar and 1.25% in Iberian pigs) and the lack of positive results of the RT-PCRs used. Instead, data from the spatial analysis suggest that the density of domestic pigs in nearby areas influences infection of European wild boar populations with PRRS virus.

SEXTA

Mediante estudios moleculares y serológicos se ha observado que el VDVB circula de manera amplia entre las poblaciones de ciervo y vacuno extensivo de la región de estudio, incluso compartiendo cepas específicas. A su vez, se ha determinado una relación significativa entre el riesgo de infección del ganado vacuno y la abundancia de ciervos en la zona. Estos hallazgos apuntan a una epidemiología compartida del VDVB mediada por el contacto entre ciervos y vacas en la interfaz DS.

SIXTH

By means of molecular and serological studies it has been observed that the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) extensively circulates among red deer and extensive cattle populations in the study area, even sharing specific viral strains. In addition, there has been a significant relationship between the risk of infection of cattle and the abundance of red deer in the area. These findings point to a shared BVDV epidemiology mediated by the contact between red deer and cattle on this domestic-wild interface.

SÉPTIMA

El estudio del patrón térmico de las morsas del Pacífico mediante termografía infrarroja ha permitido descubrir el sistema de termorregulación de estos individuos a través de ventanas térmicas distribuidas fundamentalmente por el tronco y el tercio posterior. La evidencia de este patrón apoya la necesidad de establecimiento de los patrones térmicos fisiológicos para poder aplicar la termografía como herramienta diagnóstica en animales silvestres.

SEVENTH

The study of the thermal pattern of Pacific walruses by infrared thermography has revealed the thermoregulation system of these individuals through thermal windows. These are primarily distributed through the trunk and the posterior flank of the animals. Evidence of this pattern supports the need to establish the physiological thermal patterns prior to apply thermography as a diagnostic tool in wildlife.

7. BIBLIOGRAFÍA

Fuente de la imagen: Rosalie und Trüffel (http://www.rosalie-und-trueffel.de/)

7. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, P., Escudero, M. A., Muñoz, R. y Gortazar, C. (2006). **Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain**. *Acta Theriologica* 51, 327-336.

Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Reyes-García, A. R., Alzaga, V. y Gortázar, C. (2008). **Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats**. *Journal of Zoology* 276, 37-47.

Acevedo, P., Ferreres, J., Jaroso, R., Durán, M., Escudero, M. A., Marco, J. y Gortázar, C. (2010). **Estimating roe deer abundance from pellet group counts in Spain: an assessment of methods suitable for Mediterranean woodland**. *Ecological Indicators* 10, 1226-1230.

Acevedo, P., Quirós-Fernández, F., Casal, J. y Vicente, J. (2014). **Spatial distribution of wild boar population abundance: basic information for spatial epidemiology and wildlife management**. *Ecological Indicators* 36, 594-600.

Afonso, A., Abrahantes, J. C., Conraths, F., Veldhuis, A., Elbers, A., Roberts, H., Van der Stede, Y., Meroc, E., Gache, K. y Richardson, J. (2014). **The Schmallenberg virus epidemic in Europe-2011-2013**. *Preventive Veterinary Medicine*. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.02.012.

Allepuz, A., Casal, J., Napp, S., Sáez, M., Alba, A., Vilar, M., Domingo, M., González, M. A., Durán-Ferrer, M., Vicente, J., Álvarez, J., Muñoz, M. y Sáez, J. L. (2011). **Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006-2009)**. *Preventive Veterinary Medicine* 100(1), 44-52.

Álvarez-Uría Tejero, P. y Zamorano Chico, C. (2007). **Indicadores del Observatorio de la Sostenibilidad en España (OSE). La biodiversidad en España**. *Ambienta* 65, 74-76.

Anónimo (2004). **Getting out into the field, and forest**. *The Lancet Infectious Diseases* 4(3), 127.

Apollonio, M., Anderson, R. y Putman, R. (2010). *European ungulates and their management in the 21st century*. Cambridge University Press, Cambridge.

Archie, E. A., Luikart, G. y Ezenwa, V. O. (2009). **Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology**. *Ecology and Evolution* 24, 21-30.

Armenteros, J. A., Barasona, J. A., Boadella, M., Acevedo, P., Gortázar, C. y Vicente, J. (2013). **Una propuesta para considerar aspectos sanitarios en la regulación cinegética**. *Ecosistemas* 22(2), 54-60.

Barasona, J. A., VerCauteren, K. C., Saklou, N., Gortazar, C. y Vicente, J. (2013). **Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction**. *Preventive Veterinary Medicine* 111(1-2), 42-50.

Barbić, L., Stevanović, V., Kovač, S., Maltar, L., Janković, I. L., Vilibić-Čavlek, T. y Madić, J. (2013). **West Nile virus serosurveillance in horses in Croatia during the 2012 transmission season**. *Medical Sciences* 39, 95-104.

Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Lavezzo, E., Martello, T., Squarzon, L., Toppo, S., Fiorin, F., Marchiori, G., Russo, F., Cattai, M., Cusinato, R. y Palu, G. (2012). **New endemic West Nile virus lineage 1a in northern Italy, July 2012**. *Euro Surveillance* 17(31), pii=20231.

Bengis, R. G., Kock, R. A. y Fischer, J. (2002). **Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface**. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 21(1), 53-65.

Bernardinelli, L., Clayton, D. y Montomoli, C. (1995). **Bayesian estimates of disease maps: how important are priors?** *Statistics in Medicine* 14, 2411-2431.

Biek, R. y Real, L. A. (2010). **The landscape genetics of infectious disease emergence and spread**. *Molecular Ecology* 19, 3515-3531.

Blanco, J. C. (2007). **Estado de conservación de los mamíferos de España**. En *Libro rojo de los mamíferos terrestres de España* (L. J. Palomo, J. Gisbert, and J. C. Blanco, Eds.), pp. 66-70. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid.

Boadella, M., Gortazar, C., Acevedo, P., Carta, T., Martín-Hernando, M. P., de la Fuente, J. y Vicente, J. (2011). **Six recommendations for improving monitoring of diseases shared with wildlife: examples regarding mycobacterial infections in Spain**. *European Journal of Wildlife Research* 57, 697-706.

Boadella, M. y Gortázar, C. (2011). **Effect of haemolysis and repeated freeze-thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA**. *BMC Research Notes* 4, 498.

Boadella, M., Díez-Delgado, I., Gutiérrez-Guzmán, A. V., Höfle, U. y Gortázar, C. (2012a). **Do wild ungulates allow improved monitoring of flavivirus circulation in Spain?** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12(6), 490-495.

Boadella, M., Ruiz-Fons, J. F., Vicente, J., Martín, M., Segalés, J. y Gortazar, C. (2012b). **Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar**. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(5), 395-404.

Bodewes, R., Rubio Garcia, A., Wiersma, L. C., Getu, S., Beukers, M., Schapendonk, C. M., van Run, P. R., van de Bildt, M. W., Poen, M. J., Osinga, N., Sanchez Contreras, G. J., Kuiken, T., Smits, S. L. y Osterhaus, A. D. (2013). **Novel B19-like parvovirus in the brain of a harbor seal**. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0079259.

Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M., van den Brand, J. M., Osterhaus, A. D. y Smits, S. L. (2014). **Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores**. *Virology Journal*. doi: 10.1186/1743-422X-11-89.

Borg, K. (1975). **Viltsjukdomar. LTs förlag (en sueco)**, 191 pp.

Bosch, J., Peris, S., Fonseca, C., Martínez, M., de la Torre, A., Iglesias, I. y Muñoz, M. J. (2012). **Distribution, abundance and density of the wild boar on the Iberian**

Peninsula, based on the CORINE program and hunting statistics. *Folia Zoologica* 61, 138-151.

Bréard, E., Lara, E., Comtet, L., Viarouge, C., Doceul, V., Desprat, A., Vitour, D., Pozzi, N., Cay, A. B., de Regge, N., Pourquier, P., Schirrmeier, H., Hoffmann, B., Beer, M., Sailleau, M. y Zientara, S. (2013). **Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies**. *PLoS ONE* 8, e53446.

Briones, V. (coordinador) (2000). **Reporting systems of wildlife diseases in Europe**. Disponible *online* en: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/wildnet/ (último acceso: 1 de julio de 2014).

Brook, R. K. y McLachlan, S. M. (2006). **Factors influencing farmers' concerns regarding bovine tuberculosis in wildlife and livestock around Riding Mountain Park**. *Journal of Environmental Management* 80, 156-166.

Caley, P., Hickling, G. J., Cowan, P. E. y Pfeiffer, D. U. (1999). **Effects of sustained control of brushtail possums on levels of *Mycobacterium bovis* infection in cattle and brushtail possum populations from Hohotaka, New Zealand**. *New Zealand Veterinary Journal* 47(4), 133-142.

Caley, P. y Hone, J. (2004). **Disease transmission between and within species, and the implications for disease control**. *Journal of Applied Ecology* 41(1), 94-104.

Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. y Brandt, W. E. (1989). **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera**. *Journal of General Virology* 70, 37-43.

Cameron, A. R. (2012). **The consequences of risk-based surveillance: Developing output-based standards for surveillance to demonstrate freedom from disease**. *Preventive Veterinary Medicine* 105(4), 280-286.

Carpenter, S., Wilson, A. y Mellor, P. S. (2009). ***Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe**. *Trends in Microbiology* 17(4), 172-178.

Casaubon, J., Vogt, H. R., Stalder, H., Hug, C. y Ryser-Degiorgis, M. P. (2012). **Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock**. *BMC Veterinary Research*. doi: 10.1186/1746-6148-8-204.

CE (Comisión Europea) (2013). **List of third countries that impose import restrictions to EU products concerning Schmallenberg virus (SBV) (latest update: 04/09/2013)**. Disponible *online* en: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/schmallenberg_virus/index_en.htm (último acceso: 1 de agosto de 2014).

CE (Comisión Europea) (2014). **Participant portal for Research & Innovation**. Disponible *online* en: http://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/opportunities/index.html (último acceso: 27 de junio de 2014).

Chan, J. F., To, K. K., Tse, H., Jin, D. Y. y Yuen, K. Y. (2013). **Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds**. *Trends in Microbiology* 21(10), 544-555.

Chevalier, V., Tran, A. y Durand, B. (2014). **Predictive modeling of West Nile virus transmission risk in the Mediterranean Basin: how far from landing?** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 67-90.

Chhetri, B. K., Perez, A. M. y Thurmond, M. C. (2010). **Factors associated with spatial clustering of foot-and-mouth disease in Nepal**. *Tropical Animal Health and Production* 42(7), 1441-1449.

Chiari, M., Sozzi, E., Zanoni, M., Alborali, L. G., Lavazza, A. y Cordioli, P. (2014). **Serosurvey for Schmallenberg virus in alpine wild ungulates**. *Transboundary and Emerging Diseases* 61(1), 1-3.

Chomel, B. B., Belotto, A. y Meslin, F. X. (2007). **Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses**. *Emerging Infectious Diseases* 13(1), 6-11.

Christiansen, M. (1935). *De vigtigste smittsamme Sykdomme hos vilt. Meddelelser fra Statens Veterinære Serumlaboratorium (en danés)*. State Veterinary Laboratory, Dinamarca.

Cilulko, J., Janiszewski, P., Bogdaszewski, M. y Szczygielska, E. (2013). **Infrared thermal imaging in studies of wild animals**. *European Journal of Wildlife Research* 59, 17-23.

Cleaveland, S., Laurenson, M. K. y Taylor, L. H. (2001). **Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356, 991-999.

Comin, A., Dórea, F. C., Vergne, T., Rosendal, T., Nöremark, M. y Lindberg, A. (en revisión). **Systematic review of surveillance systems for endemic diseases and methods for case detection and prevalence estimation in animal populations**. *Epidemiology and Infection*.

Cowled, B. D., Ward, M. P., Laffan, S. W., Galea, F., Garner, M. G., MacDonald, A. J., Marsh, I., Muellner, P., Negus, K., Quasim, S., Woolnough, A. P. y Sarre, S. D. (2012). **Integrating survey and molecular approaches to better understand wildlife disease ecology**. *PloS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0046310.

Cristóbal Cotarelo, I. (2011). **Análisis geográfico del solapamiento entre el ganado bovino y los ungulados cinegéticos: epidemiología de la tuberculosis bovin**. Tesis. UCLM (Universidad de Castilla-La Mancha) - IREC (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos), Ciudad Real.

Cross, P., St John, F. A., Khan, S. y Petroczi, A. (2013). **Innovative techniques for estimating illegal activities in a human-wildlife-management conflict**. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0053681.

CSIC (Museo Nacional de Ciencias Naturales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (2014). **Lista de los mamíferos de la Península Ibérica, islas Baleares e islas Canarias**. Disponible *online* en:

http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/listamamiferos.html (último acceso: 1 de julio de 2014).

Cutler, S. J., Fooks, A. R. y van der Poel, W. H. (2010). **Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world**. *Emerging Infectious Diseases* 16(1), 1-7.

Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D. (2000). **Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health**. *Science* 287, 443-449.

Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D. (2001). **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife**. *Acta Tropica* 78(2), 103-116.

de Clercq, K. (2011). **OIE policy paper related to wildlife diseases**. En *OIE Global Conference on Wildlife "Animal Health and Biodiversity – Preparing for the Future"*. 23-25 de febrero de 2011, París (Francia).

de la Fuente López, C. y Rodríguez Vigal, C. (2007). **Estado sanitario de la fauna silvestre española. Aportaciones de la sanidad animal**. *Profesión Veterinaria* 16(67), 68-72.

de la Torre, A., Bosch, J., Iglesias, I., Muñoz, M. J., Mur, L., Martínez-López, B., Martínez, M. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Assessing the risk of African swine fever introduction into the European Union by wild boar**. doi: 10.1111/tbed.12129.

Decker, D. J., Evensen, D. T., Siemer, W. F., Leong, K. M., Riley, S. J., Wild, M. A., Castle, K. T. y Higgins, C. L. (2010). **Understanding risk perceptions to enhance communication about human-wildlife interactions and the impacts of zoonotic disease**. *The Institute for Laboratory Animal Research Journal* 51(3), 255-261.

Decker, D. J., Siemer, W. F., Evensen, D. T. N., Stedman, R. C., McComas, K. A., Wild, M. A., Castle, K. T. y Leong, K. M. (2012). **Public perceptions of wildlife-associated disease: risk communication matters**. *Human-Wildlife Interactions* 6(1), 112-122.

Delahay, R. J., Smith, G. C. y Hutchings, M. R. (2009). **The science of wildlife disease management**. En *Management of Disease in Wild Animals* (R. J. Delahay, G. C. Smith, and M. R. Hutchings, Eds.), pp. 1-8. Springer, Nueva York.

Delibes-Mateos, M., Farfán, M. A., Olivero, J., Márquez, A. L. y Vargas, J. M. (2009). **Long-term changes in game species over a long period of transformation in the Iberian Mediterranean landscape**. *Environmental Management* 43(6), 1256-1268.

Di Marco, V., Mazzone, P., Capucchio, M. T., Boniotti, M. B., Aronica, V., Russo, M., Fiasconaro, M., Cifani, N., Corneli, S., Biasibetti, E., Biagetti, M., Pacciarini, M. L., Cagiola, M., Pasquali, P. y Marianelli, C. (2012). **Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily**. *Journal of Clinical Microbiology* 50(4), 1209-1218.

Díez-Delgado, I., Boadella, M., Martín-Hernando, M., Barasona, J. A., Beltrán-Beck, B., González-Barrio, D., Sibila, M., Vicente, J., Garrido, J. M., Segalés, J. y Gortazar, C.

(2014). **Complex links between natural tuberculosis and porcine circovirus type 2 infection in wild boar**. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/765715.

Dobson, A. y Foufopoulos, J. (2001). **Emerging infectious pathogens of wildlife**. *Philosophical transactions of the Royal Society of London - Series B, Biological sciences* 356(1411), 1001-1012.

Dommergues, L., Rautureau, S., Petit, E. y Dufour, B. (2012). **Network of contacts between cattle herds in a French area affected by bovine tuberculosis in 2010**. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(4), 292-302.

Dondo, A., Zoppi, S., Rossi, F., Chiavacci, L., Barbaro, A., Garrone, A., Benedetto, A. y Goria, M. (2007). **Mycobacteriosis in wild boar: results of 2000–2006 activity in North-Western Italy**. *Épidémiologie en Santé Animal* 51, 35-42.

Donnelly, C. A., Woodroffe, R., Cox, D. R., Bourne, F. J., Cheeseman, C. L., Clifton-Hadley, R. S., Wei, G., Gettinby, G., Gilks, P., Jenkins, H., Johnston, W. T., Le Fevre, A. M., McInerney, J. P. y Morrison, W. I. (2006). **Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle**. *Nature* 439(7078), 843-846.

Dove, V. y French, N. (2014). **Tool 12: geographic information systems**. En *Manual of procedures for wildlife disease risk analysis* (R. M. Jakob-Hoff, S. C. MacDiarmid, C. Lees, P. S. Miller, D. Travis, and R. Kock, Eds.), pp. 75-76. IUCN-OIE, París.

East, I. J., Wicks, R. M., Martin, P. A. J., Sergeant, E. S. G., Randall, L. A. y Garner, M. G. (2013). **Use of a multi-criteria framework to inform the design of risk based general surveillance systems for animal disease in Australia**. *Preventive Veterinary Medicine* 112, 230-247.

Ebert, C., Huckschlag, D., Schulz, H. K. y Hohmann, U. (2010). **Can hair traps sample wild boar (*Sus scrofa*) randomly for the purpose of non-invasive population estimation?** *European Journal of Wildlife Research* 56, 583-590.

ECDC (European Centre of Disease Prevention and Control) (2013). **West Nile virus risk assessment tool**. Disponible *online* en: http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/west-nile-virus-risk-assessment-tool.pdf (último acceso: 19 de junio de 2014).

EFSA (European Food Safety Authority) (2014). **Schmallenberg virus: state of art**. Disponible *online* en: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3681.htm (último acceso: 6 de agosto de 2014).

Eidson, M., Komar, N., Sorhage, F., Nelson, R., Talbot, T., Mostashari, F., McLean, R. y West Nile Virus Avian Mortality Surveillance, G. (2001). **Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999**. *Emerging Infectious Diseases* 7(4), 615-620.

Elazhary, M. A., Frechette, J. L., Silim, A. y Roy, R. S. (1981). **Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec**. *Journal of Wildlife Diseases* 17, 609-612.

Elbers, A. R. W., Loeffen, W. L. A., Quak, S., de Boer-Luijtze, E., van der Spek, A. N., Bouwstra, R., Maas, R., Spierenburg, M. A. H., de Kluijver, E. P., van Schaik, G. y van der Poel, W. H. M. (2012). **Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011-2012**. *Emerging Infectious Diseases* 18, 1065–1071.

Elliott, P., Wakefield, J., Best, N. y Briggs, D. (2000a). **Spatial epidemiology: methods and applications**. En *Spatial epidemiology: methods and applications* (P. Elliott, J. Wakefield, N. Best, and D. Briggs, Eds.), pp. 3-14. Oxford University Press, Nueva York (EEUU).

Elliott, P., Wakefield, J., Best, N. y Briggs, D. (2000b). *Spatial epidemiology: methods and applications*. Oxford University Press, Nueva York (EEUU).

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2008). **The state of world fisheries and aquaculture**. Disponible *online* en: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf (último acceso: 30 de junio de 2014).

FAOSTAT (2014). **Base de datos de indicadores agroambientales**. Disponible *online* en: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/E/*/S (último acceso: 3 de julio de 2014).

Farnsworth, M. L., Hoeting, J. A., Hobbs, N. T. y Miller, M. W. (2006). **Linking chronic wasting disease to mule deer movement scales: a hierarchical Bayesian approach**. *Ecological Applications - Ecological Society of America* 16(3), 1026-1036.

Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., Silvério, A. y Santos, P. (2003). **Habitat effects and shooting techniques on two wild boar (*Sus scrofa*) populations in Spain and Portugal**. *European Journal of Wildlife Research* 49, 120-129.

Fine, A. E., Bolin, C. A., Gardiner, J. C. y Kaneene, J. B. (2011). **A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA**. *Veterinary Medicine International*. doi: 10.4061/2011/765430.

Fischer, A., Kerezi, V., Arroyo, B., Mateos-Delibes, M., Tadie, D., Lowassa, A., Krange, O. y Skogen, K. (2013). **(De)legitimising hunting – Discourses over the morality of hunting in Europe and eastern Africa**. *Land Use Policy* 32, 261-270.

Fischer, J. R. y Gerhold, R. (2002). **La fauna silvestre como factor de riesgo para la salud animal y las zoonosis**. En *Compendio de temas técnicos presentados ante la Asamblea Mundial de los Delegados de la OIE o a las Comisiones Regionales de la OIE*.

Fitzgerald, S. D. y Kaneene, J. B. (2013). **Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: hosts, pathology, surveillance, and control**. *Veterinary Pathology* 50(3), 488-499.

FLI (Friedrich-Loeffler-Institut) (2011). **New *Orthobunyavirus* detected in cattle in Germany**. Disponible *online* en: http://www.fli.bund.de/en/startseite/press-

releases/releases/neues-orthobunyavirus-bei-rindern.html (último acceso: 6 de agosto de 2014).

Frölich, K. y Hofmann, M. (1995). **Isolation of bovine viral diarrhea virus-like pestiviruses from roe deer (*Capreolus capreolus*)**. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 243-246.

Frölich, K. (1995). **Bovine virus diarrhea and mucosal disease in free-ranging and captive deer (*Cervidae*) in Germany**. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 247-250.

Frölich, K., Marco, I. y Moennig, V. (2012). **Pestivirus infections**. En *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe* (D. Gavier-Widen, A. Meredith, and J. P. Duff, Eds.), pp. 146-167. Wiley-Blackwell Publishing, West Sussex (Reino Unido).

FSVPS (Russian Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance) (2012). **EU criticism to Russian pig import ban**. Disponible *online* en: http://www.fsvps.ru/fsvps/press/2650.html?_language=en (último acceso: 14 de agosto de 2014).

Ganter, M., Eibach, R. y Helmer, C. (2014). **Update on Schmallenberg virus infections in small ruminants**. *Small Ruminant Research* 118(1-3), 63-68.

Gardner, L. A., Hietala, S. y Boyce, W. M. (1996). **Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals**. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15(1), 323-335.

Garrido, J. L. (2012). **Valoración por subsectores**. En *La caza. Sector económico*, pp. 24. FEDENCA-EEC, Madrid.

Gerhauser, I., Weigand, M., Hahn, K., Herder, V., Wohlsein, P., Habierski, A., Varela, M., Palmarini, M. y Baumgartner, W. (2014). **Lack of Schmallenberg virus in ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany**. *Journal of Comparative Pathology* 150(2-3), 151-154.

Giacometti, M., Frey, J. y Abidoetal, M. (2000). **Infectious keratoconjunctivitis**. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 142, 235-240.

Giovannini, A. (2006). **National monitoring and surveillance**. *Veterinaria Italiana* 42(4), 407-429.

Glass, G. E. (2001). **Geographic information systems**. En *Infectious Disease Epidemiology* (K. E. Nelson, C. M. Williams, and N. M. H. Graham, Eds.), pp. 231-253. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland (EEUU).

Glawischnig, W., Schoepf, K. y Matt, M. (2010). **Monitoring for bovine viral diarrhea virus in Austrian red deer (*Cervus elaphus elaphus*) by using ear-notch samples**. *Journal of Wildlife Diseases* 46(4), 1269-1273.

GLEWS+ (2013). **The Joint FAO–OIE–WHO Global Early Warning System for health threats and emerging risks at the human–animal–ecosystems interface**. Disponible *online* en: http://www.glews.net/2013/12/glews/ (último acceso: 7 de julio de 2014).

Goller, K. V., Hoper, D., Schirrmeier, H., Mettenleiter, T. C. y Beer, M. (2012). **Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus**. *Emerging Infectious Diseases* 18(10), 1644-1646.

Gopal, R., Goodchild, A., Hewinson, G., de la Rua Domenech, R. y Clifton-Hadley, R. (2006). **Introduction of bovine tuberculosis to north-east England by bought-in cattle**. *Veterinary Record* 159(9), 265-271.

Gortazar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Gavín, P., Juste, R. A., Martín, C., Acevedo, P., de la Puente, M. y Höfle, U. (2005). **Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain**. *Veterinary Research* 36(1), 43-52.

Gortazar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R. C., Garrido, J., Aranaz, A. y de la Fuente, J. (2011). **Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife**. *Veterinary Microbiology* 151(1-2), 170-178.

Gortazar, C. y Cowan, P. (2013). **Introduction to this issue: Dealing with TB in wildlife**. *Epidemiology and Infection* 141(7), 1339-1341.

Gortázar, C., Herrero, J., Villafuerte, R. y Marco, J. (2000). **Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain**. *Mammalia* 64(4), 411-422.

Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F. y Vicente, J. (2006). **Disease risks and overabundance of game species**. *European Journal of Wildlife Research* 52(2), 81-87.

Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K. y Vicente, J. (2007). **Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective**. *European Journal of Wildlife Research* 53(4), 241-256.

Gortázar, C., Delahay, R. J., McDonald, R. A., Boadella, M., Wilson, G. J., Gavier-Widen, D. y Acevedo, P. (2011). **The status of tuberculosis in European wild mammals**. *Mammal Review* 42(3), 193-206.

Gutiérrez-Guzmán, A. V., Vicente, J., Sobrino, R., Perez-Ramírez, E., Llorente, F. y Höfle, U. (2012). **Antibodies to West Nile virus and related flaviviruses in wild boar, red foxes and other mesomammals from Spain**. *Veterinary Microbiology* 159(3-4), 291-297.

Hälli, O., Ala-Kurikka, E., Nokireki, T., Skrzypczak, T., Raunio-Saarnisto, M., Peltoniemi, O. A. y Heinonen, M. (2012). **Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar**. *Veterinary Journal* 194(1), 98-101.

Hardstaff, J. L., Marion, G., Hutchings, M. R. y White, P. C. (2013). **Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe**. *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.12.002.

Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H. y Laurenson, M. K. (2002). **Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge**. *Emerging Infectious Diseases* 8(12), 1468-1473.

Held, L. K. y Besag, J. (1997). **Modelling risk from a disease in time and space**. *Statistics in Medicine* 17, 2027-2036.

Herruzo, C. y Martinez-Jauregui, M. (2013). **Trends in hunters, hunting grounds and big game harvest in Spain**. *Forest Systems* 22(1), 114-122.

Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H. y Beer, M. (2006). **A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses**. *Journal of Virological Methods* 136(1-2), 200-209.

Hoffmann, B., Scheuch, M., Hoper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K. V., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., Mettenleiter, T. C. y Beer, M. (2012). **Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011**. *Emerging Infectious Diseases* 18(3), 469-472.

Hoffmann, B., Schulz, C. y Beer, M. (2013). **First detection of Schmallenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012**. *Veterinary Microbiology* 167(3-4), 289-295.

Hoinville, L. J., Alban, L., Drewe, J. A., Gibbens, J. C., Gustafson, L., Hasler, B., Saegerman, C., Salman, M. y Stark, K. D. (2013). **Proposed terms and concepts for describing and evaluating animal-health surveillance systems**. *Preventive Veterinary Medicine* 112(1-2), 1-12.

Hudson, P. J. (2002). **The ecology of wildlife diseases** (P. J. Hudson, Ed.). Oxford University Press, Oxford.

Hugh-Jones, M. E., Hubbert, W. T. y Hagstad, H. V. (2000). *Zoonoses: recognition, control and prevention*. Iowa State University Press, Iowa (EEUU).

Humblet, M.-F., Gilbert, M., Govaerts, M., Fauville-Dufaux, M., Walravens, K. y Saegerman, C. (2010). **New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology**. *Journal of Clinical Microbiology* 48(8), 2802-2808.

Hüssy, D., Stauber, N., Leutenegger, C. M., Rieder, S. y Ackermann, M. (2001). **Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep**. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8(1), 123-128.

Iglesias, I., Perez, A. M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Muñoz, M. J., Martínez, M. y de la Torre, A. (2011). **Reproductive ratio for the local spread of highly pathogenic avian influenza in wild bird populations of Europe, 2005-2008**. *Epidemiology and Infection* 139(1), 99-104.

INE (Instituto Nacional de Estadística) (2014). **Cifras de población y censos demográficos**. Disponible *online* en: http://www.ine.es/inebmenu/mnu_cifraspob.htm (último acceso: 3 de julio de 2014).

IUCN-OIE (International Union for Conservation of Nature en colaboración con la Organización Mundial de Sanidad Animal) (2014). **Guidelines for wildlife disease risk analysis**. Disponible *online* en: https://portals.iucn.org/library/node/43385 (último acceso: 5 de mayo de 2014).

JCyL (Junta de Castilla y León) (2014). **Portal ganadero. Fiebre del Nilo Occidental (West Nile)**. Disponible *online* en: http://www.ganaderia.jcyl.es/web/jcyl/PortalGanadero/es/Plantilla100/1284245494974/_/_ (último acceso: 25 de julio de 2014).

Jiménez-Clavero, M. A. (2012). **Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms**. *Frontiers in Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2012.00105.

Jones, B., McKeever, D., Grace, D., Pfeiffer, D., Mutua, F., Njuki, J., McDermott, J., Rushton, J., Said, M., Ericksen, P., Kock, R. y Alonso, S. (2011). **Zoonoses (Project 1). Wildlife/domestic livestock interactions. A final report to the UK Department for International Development and ILRI.** Nairobi, Kenia: ILRI and Londres, Reino Unido: Royal Veterinary College.

Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J. y Pfeiffer, D. U. (2013). **Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(21), 8399-8404.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L. y Daszak, P. (2008). **Global trends in emerging infectious diseases**. *Nature* 451(7181), 990-993.

Kahn, L. H., Kaplan, B. y Steele, J. H. (2007). **Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine')**. *Veterinaria Italiana Series* 43, 5-19.

Kaplan, B., Kahn, L. H. y Montath, T. P. (2009). **The brewing storm**. *Veterinaria Italiana Series* 45, 9-18.

Kim, S. G. y Dubovi, E. J. (2003). **A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples**. *Biologicals* 31(2), 103-106.

Kirchgessner, M. S., Dubovi, E. J. y Whipps, C. M. (2013). **Spatial point pattern analyses of bovine viral diarrhea virus infection in domestic livestock herds and concomitant seroprevalence in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York State, USA**. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(2), 226-233.

Koopmans, M. (2013). **Surveillance strategy for early detection of unusual infectious disease events**. *Current Opinion in Virology* 3(2), 185-191.

Korimbocus, J., Coates, D., Barker, I. y Boonham, N. (2002). **Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay**. *Journal of Virological Methods* 103(2), 109-120.

Kuiken, T., Leighton, F. A., Fouchier, R. A. M., LeDuc, J. W., Peiris, J. S. M., Schudel, A., Stohr, K. y Osterhaus, A. D. M. E. (2005). **Pathogen surveillance in animals**. *Science* 309(5741), 1680-1681.

Kuiken, T., Ryser-Degiorgis, M. P., Gavier-Widen, D. y Gortazar, C. (2011). **Establishing a European network for wildlife health surveillance**. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 30(3), 755-761.

Kukielka, D., Rodríguez-Prieto, V., Vicente, J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión). **Constant HEV circulation in wild boar and red deer in Spain: an increasing concern source of HEV zoonotic transmission**. *Transboundary and Emerging Diseases*.

Kukielka, E., Barasona, J. A., Cowie, C. E., Drewe, J. A., Gortazar, C., Cotarelo, I. y Vicente, J. (2013). **Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps**. *Preventive Veterinary Medicine* 112(3-4), 213-221.

Laloy, E., Bréard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Zientara, S., Klein, F., Hars, J. y Rossi, S. (2014). **Schmallenberg virus infection among red deer, France, 2010-2012**. *Emerging Infectious Diseases* 20(1), 131-134.

Langedijk, J. P., Middel, W. G., Meloen, R. H., Kramps, J. A. y de Smit, J. A. (2001). **Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine**. *Journal of Clinical Microbiology* 39(3), 906-912.

Larska, M., Krzysiak, M., Smreczak, M., Polak, M. P. y Zmudzinski, J. F. (2013). **First detection of Schmallenberg virus in elk (*Alces alces*) indicating infection of wildlife in Bialowieza National Park in Poland**. *Veterinary Journal* 198, 279-281.

Leighton, F. A. (1995). **Surveillance of wild animal diseases in Europe**. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 14(3), 819-830.

Liddle, M. (1997). *Recreation ecology: the ecological impact of outdoor recreation and ecotourism*. Chapman & Hall Ltd., Londres (Reino Unido).

Lillehaug, A., Vikoren, T., Larsen, I. L., Akerstedt, J., Tharaldsen, J. y Handeland, K. (2003). **Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids**. *Journal of Wildlife Diseases* 39(4), 779-786.

Lindquist, C. D., Evans, J. J. y Wictum, E. J. (2011). **Developmental validation of feline, bovine, equine, and cervid quantitative PCR assays**. *Journal of Forensic Sciences* 56(Suppl. 1), S29-S35.

Lizana, M. y Viejo, J. L. (2007). **La diversidad animal de España**. En *Documentación administrativa nº 278-279 de mayo-diciembre 2007. Número extraordinario sobre biodiversidad* (I. N. d. A. Pública, Ed.). INAP, Madrid.

Lorch, J. M., Meteyer, C. U., Behr, M. J., Boyles, J. G., Cryan, P. M., Hicks, A. C., Ballmann, A. E., Coleman, J. T., Redell, D. N., Reeder, D. M. y Blehert, D. S. (2011). **Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome**. *Nature* 480(7377), 376-378.

Luttikholt, S., Veldhuis, A., van den Brom, R., Moll, L., Lievaart-Peterson, K., Peperkamp, K., van Schaik, G. y Vellema, P. (2014). **Risk factors for malformations and**

impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallenberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS ONE* 9(6), e100135.

Madroño, A., González, C. y Atienza, J. (2004). Libro rojo de las aves de España Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife, Madrid.

Maple, T. L. (2007). **Toward a science of welfare for animals in the zoo**. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 10(1), 63-70.

Marra, P. P., Griffing, S. M., Caffrey, C., Kilpatrick, A. M., McLean, R. G., Brand, C., Saito, E., Dupuis, A. P., Kramer, L. D. y Novak, R. (2004). **West Nile virus and wildlife**. *BioScience* 54(5), 393-402.

Martin, C., Letellier, C., Caij, B., Gauthier, D., Jean, N., Shaffii, A. y Saegerman, C. (2011a). **Epidemiology of *Pestivirus* infection in wild ungulates of the French South Alps**. *Veterinary Microbiology* 147(3-4), 320-328.

Martin, C., Pastoret, P. P., Brochier, B., Humblet, M. F. y Saegerman, C. (2011b). **A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe**. *Veterinary Research* 42, 70.

Martínez-Avilés, M., Rodríguez-Prieto, V., Comin, A., Dórea, F. y Schauer, B. (2014). **Review of surveillance systems in place in the European Union**. *Deliverables 2.1, 3.1 and 4.1 of the RiskSur project*.

Martínez-López, B., Martínez Avilés, M., Iglesias Martín, I., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Matamoros, A., Fernández Calle, L. M., Fernández Salazar, M., González González, Y., Grau Vila, A., Marqués Prendes, S., Muñoz Reoyo, M. J., de la Torre Reoyo, A., Linares, F., Sánchez-Vizcaíno Buendía, F., Perez, A., López de Ayala, M., Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J. M. y Mínguez González, O. (2013a). *Desarrollo de un sistema integral para la mejora de la vigilancia, control y gestión de enfermedades exóticas, emergentes y zoonósicas que afectan al sector ganadero en Castilla y León*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Martínez-López, B., Barasona, J. A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2013b). **Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain**. *Preventive Veterinary Medicine*. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.002.

Martínez Avilés, M. (2010). **Evaluación del riesgo de entrada de gripe aviar de alta patogenicidad en España mediante la llegada de aves migratorias invernantes**. Tesis. UCM (Universidad Complutense de Madrid), Madrid.

Martínez, M., Perez, A. M., de la Torre, A., Iglesias, I., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Muñoz, M. J. (2011). **Evaluating surveillance in wild birds by the application of risk assessment of avian influenza introduction into Spain**. *Epidemiology and Infection* 139(1), 91-98.

Martins Braga, E., Silveira, P., Oliveira Belo, N. y Valkiunas, G. (2011). **Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106(supl. 1), 3-11.

Mauck, B., Bilgmann, K., Jones, D. D., Eysel, U. y Dehnhardt, G. (2003). **Thermal windows on the trunk of hauled-out seals: hot spots for thermoregulatory evaporation?** *Journal of Experimental Biology* 206(Pt 10), 1727-1738.

McInerney, J., Small, K. J. y Caley, P. (1995). **Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory**. *Australian Veterinary Journal* 72(12), 448-451.

McKenzie, J., Simpson, H. y Langstaff, I. (2007). **Development of methodology to prioritise wildlife pathogens for surveillance**. *Preventive Veterinary Medicine* 81(1-3), 194-210.

Melero, M., Casado, S. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2009). **Application of the thermography for the evaluation of the fertility in eggs of *Falco naumanni***. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3, 60-68.

Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Delclaux, M., García-Millán, I., Martínez-Nevado, E., Fernández-Morán, J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión-a). **Diagnosis and monitoring of pregnancy in Rothschild's giraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*) by infrared thermography**. *BMC Veterinary Research*.

Melero, M., Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., García, D. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (en revisión-b). **Thermal reference points as index for monitoring body core temperature in marine mammals**. *BMC Research Notes*.

Mentaberre, G., Romero, B., de Juan, L., Navarro-González, N., Velarde, R., Mateos, A., Marco, I., Olive-Boix, X., Domínguez, L., Lavín, S. y Serrano, E. (2014). **Long-term assessment of wild boar harvesting and cattle removal for bovine tuberculosis control in free ranging populations**. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0088824.

Méroc, E., Poskin, A., Van Loo, H., Van Driessche, E., Czaplicki, G., Quinet, C., Riocreux, F., de Regge, N., Caij, B., van den Berg, T., Hooyberghs, J. y van der Stede, Y. (2013). **Follow-up of the Schmallenberg Virus Seroprevalence in Belgian Cattle**. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12202.

Messenger, A. M., Barnes, A. N. y Gray, G. C. (2014). **Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals**. *PLoS ONE* 9(2), e89055.

Miller, R. S., Farnsworth, M. L. y Malmberg, J. L. (2013). **Diseases at the livestock-wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States**. *Preventive Veterinary Medicine* 110(2), 119-32.

Montagnaro, S., Sasso, S., De Martino, L., Longo, M., Iovane, V., Ghiurmino, G., Pisanelli, G., Nava, D., Baldi, L. y Pagnini, U. (2010). **Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (Sus scrofa) in Campania Region, Italy**. *Journal of Wildlife Diseases* 46(1), 316-319.

Mörner, T., Obendorf, D. L., Artois, M. y Woodford, M. H. (2002). **Surveillance and monitoring of wildlife diseases**. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties* 21(1), 67-76.

Mörner, T. y Beasley, V. (2012). **Chapter 22: Monitoring for Diseases in Wildlife Populations**. En *Ecosystem Health and Sustainable Agriculture* (L. Norrgren, and J. Levengood, Eds.), pp. 186-190. The Baltic University Programme, Uppsala (Suecia).

Moutou, F. (2004). **Même en épidémiologie, un peu de zoologie ne peut pas faire de mal**. *Épidémiologie et Santé Animale* 45, 121-123.

Moutou, F. (2007). *La vengeance de la civette masquée*. Le Pommier, París (Francia).

Müller, T., Teuffert, J., Ziedler, K., Possardt, C., Kramer, M., Staubach, C. y Conraths, F. J. (1998). **Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany**. *Journal of Wildlife Diseases* 34(2), 251-258.

Muñoz, P. M., Boadella, M., Arnal, M., de Miguel, M. J., Revilla, M., Martínez, D., Vicente, J., Acevedo, P., Oleaga, A., Ruiz-Fons, F., Marin, C. M., Prieto, J. M., de la Fuente, J., Barral, M., Barberán, M., de Luco, D. F., Blasco, J. M. y Gortázar, C. (2010). **Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates**. *BMC Infectious Diseases* 10, 46.

Nemeth, N. M., Beckett, S., Edwards, E., Klenk, K. y Komar, N. (2007). **Avian mortality surveillance for West Nile virus in Colorado**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(3), 431-437.

Nusser, S. M., Clark, W. R., Otis, D. L. y Huang, L. (2008). **Sampling considerations for disease surveillance in wildlife populations**. *Journal of Wildlife Management* 72(1), 52-60.

O'Mairtin, D., Williams, D. H., Griffin, J. M., Dolan, L. A. y Eves, J. A. (1998). **The effect of a badger removal programme on the incidence of tuberculosis in an Irish cattle population**. *Preventive Veterinary Medicine* 34(1), 47-56.

O'Leary, D. R., Marfin, A. A., Montgomery, S. P., Kipp, A. M., Lehman, J. A., Biggerstaff, B. J., Elko, V. L., Collins, P. D., Jones, J. E. y Campbell, G. L. (2004). **The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002**. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases* 4, 61-70.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (1999). **Informe de la reunión del grupo de trabajo de la OIE sobre enfermedades de los animales salvajes, París, 19-21 de octubre de 1999**. Disponible *online* en: http://www.oie.int/doc/ged/D5186.PDF (último acceso: 7 de mayo de 2014).

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2010). **Manual de formación sobre las enfermedades y la vigilancia de los animales silvestres.** Disponible *online* en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Internationa_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/E_Training_Manual_Wildlife.pdf (último acceso: 5 de mayo de 2014).

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2013). **Código sanitario para los animales terrestres**. Disponible *online* en: http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/ (último acceso: 7 de mayo de 2014).

Oleksiewicz, M. B., Donaldson, A. I. y Alexandersen, S. (2001). **Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues**. *Journal of Virological Methods* 92(1), 23-35.

Osnas, E. E., Heisey, D. M., Rolley, R. E. y Samuel, M. D. (2009). **Spatial and temporal patterns of chronic wasting disease: fine-scale mapping of a wildlife epidemic in Wisconsin**. *Ecological Applications - Ecological Society of America* 19(5), 1311-1322.

Ostfeld, R. y Holt, R. (2004). **Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs**. *Frontiers in Ecology and Evolution* 2, 13-20.

Ostfeld, R. S., Glass, G. E. y Keesing, F. (2005). **Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline**. *Trends in Ecology and Evolution* 20(6), 328-336.

Owen, J. C. (2011). **Collecting, processing, and storing avian blood: a review**. *Journal of Field Ornithology* 82(4), 339-354.

Palmer, M. V., Thacker, T. C., Waters, W. R., Gortazar, C. y Corner, L. A. (2012). ***Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans**. *Veterinary Medicine International*. doi: 10.1155/2012/236205.

Pedersen, A. B., Jones, K. E., Nunn, C. L. y Altizer, S. A. (2007). **Infectious disease and mammalian extinction risk**. *Conservation Biology* 21, 1269-1279.

Pérez de Diego, A. C. (2012). **Estudio comparativo de la respuesta inmune inducida por dos tipos de vacunas (VLP e inactivada) frente al virus de la lengua azul en ganado ovino**. Tesis. UCM (Universidad Complutense de Madrid), Madrid.

Pérez de Diego, A. C., Sánchez-Cordón, P. J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Bluetongue in Spain: from the first outbreak to 2012**. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12068.

Pfeiffer, D., Robinson, T. P., Stevenson, M., Stevens, D. J., Rogers, D. J. y Clements, A. C. A. (2008). *Spatial analysis in epidemiology*. Oxford University Press, Oxford (Reino Unido).

Pfeiffer, D. U. (2004). **Geographical information science and spatial analysis in animal health**. En *GIS and Spatial Analysis in Veterinary Science* (P. Durr, and A. Gatrell, Eds.), pp. 119-144. CABI Publishing, Wallingford (Reino Unido).

Ponsart, C., Pozzi, N., Bréard, E., Catinot, V., Viard, G., Sailleau, C., Viarouge, C., Gouzil, J., Beer, M., Zientara, S. y Vitour, D. (2014). **Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen**. *Veterinary Research*. doi: 10.1186/1297-9716-45-37.

Probst, C., Freuling, C., Moser, I., Geue, L., Kohler, H., Conraths, F. J., Hotzel, H., Liebler-Tenorio, E. M. y Kramer, M. (2011). **Bovine tuberculosis: making a case for effective surveillance**. *Epidemiology and Infection* 139(1), 105-112.

Pruvot, M., Kutz, S., van der Meer, F., Musiani, M., Barkema, H. W. y Orsel, K. (2014). **Pathogens at the livestock-wildlife interface in Western Alberta: does transmission route matter?** *Veterinary Research* 45, 18.

RASVE (Red de Alerta Sanitaria Veterinaria) (2013). **Plan nacional de vigilancia sanitaria en fauna silvestre**. Disponible *online* en: http://rasve.mapa.es/publica/programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5CFAUNA%20SILVESTRE%5CPLAN%20NACIONAL%20DE%20VIGILANCIA%20EN%20FAUNA%20SILVESTRE.PDF (último acceso: 8 de mayo de 2014).

RASVE (Red de Alerta Sanitaria Veterinaria) (2014a). **Programa nacional de vigilancia epidemiológica de peste porcina clásica, peste porcina africana, enfermedad vesicular porcina y enfermedad de Aujeszky en poblaciones de jabalíes**. Disponible *online* en: http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/FAUNA%20SILVESTRE/PROGRAMA%20NACIONAL%20DE%20VIGILANCIA%20SANITARIA%20EN%20JABALIES%202014.PDF (último acceso: 8 de julio de 2014).

RASVE (Red de Alerta Sanitaria Veterinaria) (2014b). **Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina presentado por España para el año 2014**. Disponible *online* en: http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/2014/TUBERCULOSIS%20BOVINA/PROGRAMA%20TB%202014.PDF (último acceso: 20 de julio de 2014).

Real, L. A. y Biek, R. (2007). **Spatial dynamics and genetics of infectious diseases on heterogeneous landscapes**. *Journal of the Royal Society: Interface* 4(16), 935-948.

Rhyan, J. C. y Spraker, T. R. (2007). **Emergence of diseases from wildlife reservoirs**. *Veterinary Pathology* 47(1), 34-39.

Richman, L. K., Montali, R. J., Garber, R. L., Kennedy, M. A., Lehnhardt, J., Hildebrandt, T., Schmitt, D., Hardy, D., Alcendor, D. J. y Hayward, G. S. (1999). **Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants**. *Science* 283(5405), 1171-1176.

Risco, D., Fernández-Llario, P., García-Jiménez, W. L., Gonçalves, P., Cuesta, J. M., Martínez, R., Sanz, C., Sequeda, M., Gómez, L., Carranza, J. y Hermoso de Mendoza, J. (2013). **Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations**. *Transboundary and Emerging Diseases* 60 (Suppl. 1), 121-127.

Robinson, T. P. (2000). **Spatial statistics and geographical information systems in epidemiology and public health**. En *Advances in parasitology* (S. I. Hay, S. E. Randolph, and D. J. Rogers, Eds.), pp. 81-128. Academic Press, Philadelphi, Pennsylvania (EEUU).

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Martínez, M., Muñoz, M. J. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012a). **Identification of suitable areas for West Nile virus outbreaks in equid populations for application in surveillance plans: the example of the Castile and Leon region of Spain**. *Epidemiology and Infection* 140(9), 1617-1631.

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J. A., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaino, J. M. y Vicente, J. (2012b). **A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain**. *BMC Veterinary Research* 8, 148.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Barasona, J. A., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (2013a). **Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain**. *European Journal of Wildlife Research* 59(6), 859-867.

Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., Melero, M., García, D. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013b). **Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (*Odobenus rosmarus divergens*) in a controlled environment**. *Marine Mammal Science* 29(1), 167-176.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Mouriño, M., Paradell, H., Plaja, L., Urniza, A. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014a). **Natural immunity of sheep and lambs against the Schmallenberg virus infection**. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12256.

Rodríguez-Prieto, V., Vicente-Rubiano, M., Sánchez-Matamoros, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Hoinville, L., Vergne, T., Comin, A., Schauer, B., Dórea, F., Pfeiffer, D. U. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014b). **Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations**. *Epidemiology and Infection*. doi: 10.1017/S095026881400212X.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Rivera-Arroyo, B., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Sánchez-Vizcaíno, J. M. y Vicente, J. (en revisión). **Molecular evidence of shared BVD epidemiology between red deer and extensive cattle in South Central Spain**. *Veterinary Microbiology*.

Rubio García, A., Rodríguez Prieto, V., Kukielka Zunzunegui, D. y Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J. M. (2007). **Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS**. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1(2), 646-653.

Ruiz-Fons, F., Sánchez-Matamoros, A., Gortázar, C. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014). **The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: lessons learned after the natural infection in Spain**. *Virus Research* 182, 50-58.

Sáez-Royuela, C. y Telleria, J. L. (1986). **The increased population of the wild boar (*Sus scrofa* l) in Europe**. *Mammal Review* 16, 97-101.

Sánchez-Matamoros, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Rodríguez-Prieto, V., Iglesias, E. y Martínez-López, B. (en revisión). **Identification of suitable areas for African horse sickness virus infections in Spanish equidae populations**. *Transboundary and Emerging Diseases*.

Sánchez-Vizcaíno, F., Martínez-López, B. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Identification of suitable areas for the occurrence of Rift Valley fever outbreaks in Spain**

using a multiple criteria decision framework. *Veterinary Microbiology* 165(1-2), 71-78.

Sánchez-Vizcaíno, J. M., Martínez-Avilés, M., Sánchez-Matamoros, A. y Rodríguez-Prieto, V. (en revisión). **Emerging vector-borne diseases and any potential to prevent their spread**. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*.

Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Pisciella, M., Terregino, C., Marangon, S., Capua, I. y Lelli, R. (2012). **Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy**. *Veterinary Microbiology* 158(3-4), 267-273.

Schaefer, A. L., Cook, N. J., Church, J. S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C. y Tong, A. K. (2007). **The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves**. *Research in Veterinary Science* 83(3), 376-384.

Schauer, B., Staubach, C., Schulz, K., Vergne, T., Comin, A., Höreth-Böntgen, D., Fröhlich, A., Stärk, K. D. C., Cameron, A. y Conraths, F. J. (en revisión). **Systematic review of surveillance systems and methods for certifying freedom from disease in animal populations**. *Epidemiology and Infection*.

Scheaffer, R. L., Mendenhall, W., Ott, R. L. y Gerow, K. (2011). **Estimating population size**. En *Elementary survey sampling, 7th edition*, pp. 312-335. Cengage Learning.

Schulz, C., Wernike, K., Beer, M. y Hoffmann, B. (2014). **Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany**. *Emerging Infectious Diseases* 20(2), 338-340.

Sheldon, L. D., Chin, E. H., Gill, S. A., Schmaltz, G., Newman, A. E. M. y Soma, K. K. (2008). **Effects of blood collection on wild birds: an update**. *Journal of Avian Biology* 39, 369-378.

Siembieda, J. L., Kock, R. A., McCracken, T. A. y Newman, S. H. (2011). **The role of wildlife in transboundary animal diseases**. *Animal Health Research Reviews* 12(1), 95-111.

Smith, K. F., Acevedo-Whitehouse, K. y Pedersen, A. B. (2009). **The role of infectious diseases in biological conservation**. *Animal Conservation*. doi: 10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x.

Snieszko, S. F. (1973). **Diseases of fishes and their control in the U.S.** En *The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report*, pp. 55-66. Jansen, Londres.

Sommer, S. (2005). **The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation**. *Frontiers in Zoology*. doi: 10.1186/1742-9994-2-16.

Speakman, J. R. y Ward, S. (1998). **Infrared thermography: principles and applications**. *Zoology* 101, 224-232.

Stärk, K. D. C., Regula, G., Hernandez, J., Knopf, L., Fuchs, K., Morris, R. S. y Davies, P. (2006). **Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary**

medicine and veterinary public health: review of current approaches. *BMC Health Services Research*. doi: 10.1186/1472-6963-6-20.

Staubach, C., Schmid, V., Knorr-Held, L. y Ziller, M. (2002). **A Bayesian model for spatial wildlife disease prevalence data**. *Preventive Veterinary Medicine* 56(1), 75-87.

Steinrigl, A., Schiefer, P., Schleicher, C., Peinhopf, W., Wodak, E., Bago, Z. y Schmoll, F. (2014). **Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013**. *Preventive Veterinary Medicine*. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.03.006.

Stephen, C. (2014). **Toward a modernized definition of wildlife health**. *Journal of Wildlife Diseases* 50(3), 427-430.

Tackmann, K., Löschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H. H. y Conraths, F. J. (1998). **Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart 1863) (Cestoda: *Cyclophyllidea*: *Taeniidae*) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany**. *Epidemiology and Infection* 120(1), 101-109.

Tarlinton, R., Daly, J., Dunham, S. y Kydd, J. H. (2013). **Schmallenberg virus: could wildlife reservoirs threaten domestic livestock?** *Veterinary Journal* 198, 309-310.

Taylor, L. H., Latham, S. M. y Woolhouse, M. E. (2001). **Risk factors for human disease emergence**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356(1411), 983-999.

Temmam, S., Davoust, B., Berenger, J.-M., Raoult, D. y Desnues, C. (2014). **Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection?** *International Journal of Molecular Sciences* 15, 10377-10397.

Thorne, E. T., Miller, M. W., Schmitt, S. M., Kreeger, T. J. y Williams, E. S. (2000). **Conflicts of authority and strategies to address wildlife diseases**. En *104th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. 20-27 de octubre de 2000, Birmingham, Alabama (EEUU), 123-137.

Tompkins, D. M., Dunn, A. M., Smith, M. J. y Telfer, S. (2011). **Wildlife diseases: from individuals to ecosystems**. *Journal of Animal Ecology* 80(1), 19-38.

Turespaña (2014). **Ecoturismo en España**. Disponible *online* en: http://www.spain.info/es/que-quieres/naturaleza/ecoturismo/ (último acceso: 1 de julio de 2014).

Turner, M. M., Deperno, C. S., Conner, M. C., Eyler, T. B., Lancia, R. A., Klaver, R. W. y Stoskopf, M. K. (2013). **Habitat, wildlife, and one health: *Arcanobacterium pyogenes* in Maryland and Upper Eastern Shore white-tailed deer populations**. *Infection, Ecology & Epidemiology*. doi: 10.3402/iee.v3i0.19175.

Turner, T. A. (1991). **Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation**. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 7, 311-338.

Valiakos, G., Papaspyropoulos, K., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Tsiodras, S., Hutchings, M. R., Spyrou, V., Pervanidou, D., Athanasiou, L. V., Papadopoulos, N., Tsokana, C., Baka, A., Manolakou, K., Chatzopoulos, D., Artois, M., Yon, L., Hannant, D.,

Petrovska, L., Hadjichristodoulou, C. y Billinis, C. (2014). **Use of wild bird surveillance, human case data and GIS spatial analysis for predicting spatial distributions of West Nile virus in Greece**. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0096935.

Vallat, B. (2008). **Improving wildlife surveillance for its protection while protecting us from the diseases it transmits**. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 3, Editorial, 1-3.

van den Doel, P. B., Rodríguez-Prieto, V., van Rossum-Fikkert, S., Schaftenaar, W., Latimer, E., Howard, L., Masters, N., Dastjerdi, A., Ling, P. D., Osterhaus, A. D. M. E. y Martina, B. (en revisión). **Seroprevalence of IgG antibodies to elephant endothelial herpes virus in captive Asian elephants in European and North American zoos**. *Veterinary Research*.

van der Fels-Klerx, H. J., Horst, H. S. y Dijkhuizen, A. A. (2000). **Risk factors for bovine respiratory disease in dairy youngstock in The Netherlands: the perception of experts**. *Livestock Production Science* 66, 35-46.

Van der Poel, W. H., Parlevliet, J. M., Verstraten, E. R., Kooi, E. A., Hakze-van der Honing, R. y Stockhofe, N. (2014). **Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls**. *Epidemiology and Infection* 142(7), 1495-1500.

Vasickova, P., Kralik, P., Slana, I. y Pavlik, I. (2012). **Optimisation of a triplex real time RT-PCR for detection of hepatitis E virus RNA and validation on biological samples**. *Journal of Virological Methods* 180(1-2), 38-42.

Veldhuis, A. M., Carp-van Dijken, S., van Wuijckhuise, L., Witteveen, G. y van Schaik, G. (2014a). **Schmallenberg virus in Dutch dairy herds: potential risk factors for high within-herd seroprevalence and malformations in calves, and its impact on productivity**. *Veterinary Microbiology* 168(2-4), 281-293.

Veldhuis, A. M., Santman-Berends, I. M., Gethmann, J. M., Mars, M. H., van Wuyckhuise, L., Vellema, P., Holsteg, M., Horeth-Bontgen, D., Conraths, F. J. y van Schaik, G. (2014b). **Schmallenberg virus epidemic: Impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany**. *Preventive Veterinary Medicine*. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.04.015.

Vengust, G., Valencak, Z. y Bidovec, A. (2006). **A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia**. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53(1), 24-27.

Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M. y Gortázar, C. (2004). **Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*)**. *Veterinary Research* 35(2), 243-253.

Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M. y Gortazar, C. (2006). **Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain**. *Veterinary Research* 37(1), 107-119.

Villafuerte, R. y Delibes-Mateos, M. (2007). **El conejo**. En *Libro rojo de los mamíferos terrestres de España* (L. J. Palomo, J. Gisbert, and J. C. Blanco, Eds.), pp. 487-491. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid.

Virgós, E., Cabezas-Díaz, S. y Lozano, J. (2007). **Is the wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) a threatened species in spain? Sociological constraints in the conservation of species**. *Biodiversity and Conservation* 16, 3489-3504.

Walter, W. D., Walsh, D. P., Farnsworth, M. L., Winkelman, D. L. y Miller, M. W. (2011). **Soil clay content underlies prion infection odds**. *Nature Communications* 2, 1-6.

Walter, W. D., Anderson, C. W., Smith, R., Vanderklok, M., Averill, J. J. y Vercauteren, K. C. (2012). **On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review and recommendations**. *Veterinary Medicine International*. doi: 10.1155/2012/616318.

Walter, W. D., Smith, R., Vanderklok, M. y VerCauteren, K. C. (2014). **Linking bovine tuberculosis on cattle farms to white-tailed deer and environmental variables using Bayesian hierarchical analysis**. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0090925.

Wang, S., Li, J., Zhang, A., Liu, M. y Zhang, H. (2011). **Selection of reference genes for studies of porcine endometrial gene expression on gestational day 12**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408(2), 265-268.

Warns-Petit, E., Artois, M. y Calavas, D. (2009). **Biosurveillance de la faune sauvage**. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 162(3), 205-213.

Warns-Petit, E. (2009). **Components of a national wildlife heath programme**. En *Workshop for OIE National Focal Point on Wildlife*. 5 de noviembre de 2009, Lyon (Francia).

Webster, M. S., Marra, P. P., Haig, S. M., Bensch, S. y Holmes, R. T. (2002). **Links between worlds: unraveling migratory connectivity**. *Trends in Ecology and Evolution* 17(2), 76-83.

Wernike, K., Eschbaumer, M., Schirrmeier, H., Blohm, U., Breithaupt, A., Hoffmann, B. y Beer, M. (2013). **Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle**. *Veterinary Microbiology* 165(1-2), 155-159.

Wilcox, B. A. y Gubler, D. J. (2005). **Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens**. *Environmental Health and Preventive Medicine* 10(5), 263-72.

Williams, E. S., Yuill, T., Artois, M., Fischer, J. y Haigh, S. A. (2002). **Emerging infectious diseases in wildlife**. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties* 21(1), 139-157.

Wilson, P. J. y White, B. N. (1998). **Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*), and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction**. *Journal of Forensic Sciences* 43(3), 477-482.

Wobeser, G. A. (2007). **Section III: Disease management**. En *Disease in Wild Animals: Investigation and Management* (D. Czeschlik, Ed.), pp. 183-340. Springer, Heidelberg (Alemania).

Woodford, M. H. (2009). **Veterinary aspects of ecological monitoring: the natural history of emerging infectious diseases of humans, domestic animals and wildlife**. *Tropical Animal Health and Production* 41(7), 1023-1033.

Woolhouse, M. E. y Gowtage-Sequeria, S. (2005). **Host range and emerging and reemerging pathogens**. *Emerg Infect Dis* 11(12), 1842-7.

Woolhouse, M. E. J. (2002). **Population biology of emerging and re-emerging pathogens**. *Trends in Microbiology* 10(10), S3-S7.

Yale, G., Bhanurekha, V. y Ganesan, I. (2013). **Anthropogenic factors responsible for emerging and re-emerging infectious diseases**. *Current Science* 105(7), 940-946.

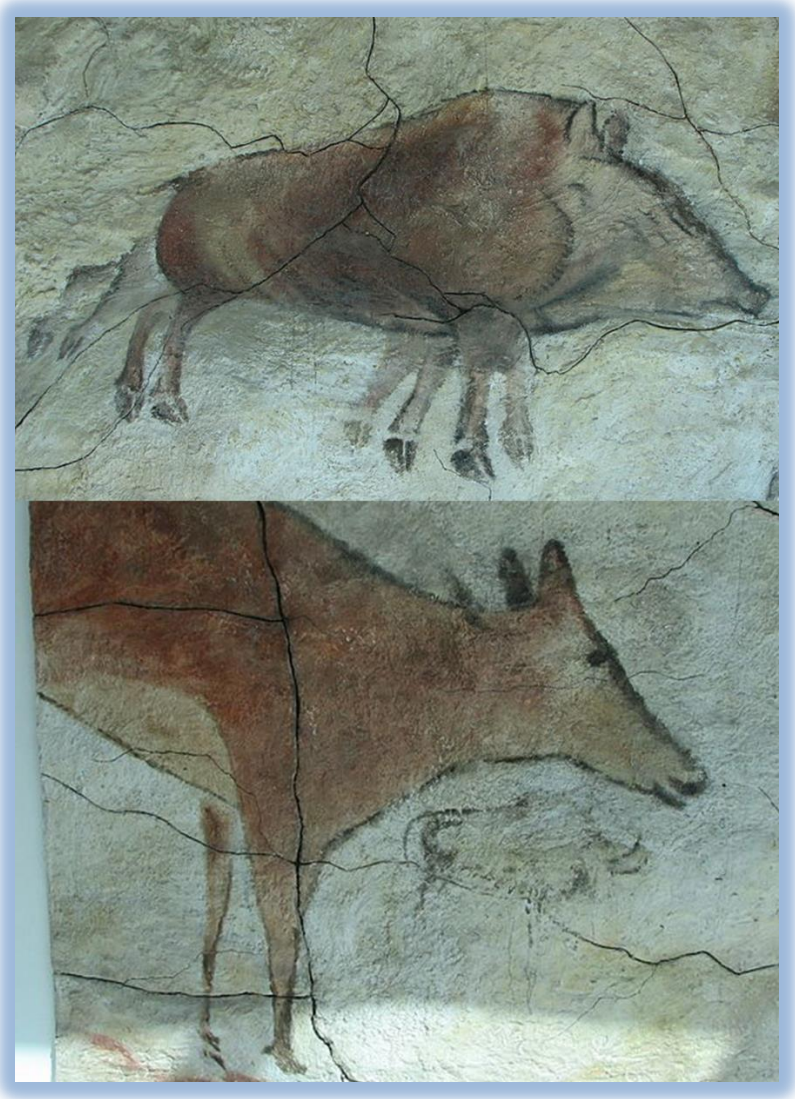
Ziegler, U., Seidowski, D., Globig, A., Fereidouni, S. R., Ulrich, R. G. y Groschup, M. H. (2010). **Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany**. *Archives of Virology* 155(6), 965-969.

Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D. y Tanner, M. (2011). **From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being**. *Preventive Veterinary Medicine* 101(3-4), 148-156.

Zupancic, Z., Jukic, B., Lojkic, M., Cac, Z., Jemersic, L. y Staresina, V. (2002). **Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia**. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 49(5), 253-256.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. y Smith, G. M. (2009). **Mixed effects modelling for nested data**. En *Mixed effects models and extensions in ecology with R*, pp. 101-142. Springer, Nueva York (EEUU).

BIBLIOGRAFÍA



8. ANEXOS

Composición propia. Fuente original de las imágenes: HTO, 2009, pinturas rupestres de Altamira, museo de Anthropos de Brno (República Checa) [dominio público]

8. ANEXOS

Anexo 1. Nomenclatura de las unidades territoriales estadísticas (NUTS) de España con sus respectivos códigos, asociado a las biorregiones

NUTS 1		NUTS 2		NUTS 3		BIORREGIONES
Área	Cód.	Área	Cód.	Área	Cód.	Cód.
NOROESTE	ES1	Galicia	ES11	A Coruña	ES111	BR1
				Lugo	ES112	
				Ourense	ES113	
				Pontevedra	ES114	
		Principado de Asturias	ES12	Principado de Asturias	ES120	
		Cantabria	ES13	Cantabria	ES130	
NORESTE	ES2	País Vasco	ES21	Álava	ES211	BR2
				Guipúzcoa	ES212	BR1
				Vizcaya	ES213	
		Comunidad Foral de Navarra	ES22	Comunidad Foral de Navarra	ES220	BR2
		La Rioja	ES23	La Rioja	ES230	
		Aragón	ES24	Huesca	ES241	
				Teruel	ES242	BR4
				Zaragoza	ES243	BR2
COM. DE MADRID	ES3	Comunidad de Madrid	ES30	Comunidad de Madrid	ES300	BR4
CENTRO	ES4	Castilla y León	ES41	Ávila	ES411	BR3
				Burgos	ES412	BR2
				León	ES413	
				Palencia	ES414	
				Salamanca	ES415	BR3
				Segovia	ES416	BR2
				Soria	ES417	BR4
				Valladolid	ES418	BR2
				Zamora	ES419	
		Castilla-La Mancha	ES42	Albacete	ES421	BR4
				Ciudad Real	ES422	BR3
				Cuenca	ES423	BR4
				Guadalajara	ES424	
				Toledo	ES425	BR3
		Extremadura	ES43	Badajoz	ES431	
				Cáceres	ES432	
ESTE	ES5	Cataluña	ES51	Barcelona	ES511	BR5
				Girona	ES512	
				Lleida	ES513	BR2
				Tarragona	ES514	BR5
		Comunidad Valenciana	ES52	Alicante	ES521	
				Castellón	ES522	
				Valencia	ES523	
		Islas Baleares	ES53	Islas Baleares	ES530	

NUTS 1		NUTS 2		NUTS 3		BIORREGIONES
Área	Cód.	Área	Cód.	Área	Cód.	Cód.
SUR	ES6	Andalucía	ES61	Almería	ES611	BR5
				Cádiz	ES612	
				Córdoba	ES613	BR3
				Granada	ES614	BR5
				Huelva	ES615	
				Jaén	ES616	BR3
				Málaga	ES617	BR5
				Sevilla	ES618	BR3
		Región de Murcia	ES62	Región de Murcia	ES621	BR5
		Ciudad Autónoma de Ceuta	ES63	Ceuta	ES630	
		Ciudad Autónoma de Melilla	ES64	Melilla	ES640	
CANARIAS	ES7	Canarias	ES70	Las Palmas	ES701	BR7
				Santa Cruz de Tenerife	ES702	

Anexo 2. Lista de las 53 enfermedades que no figuran en la lista de la OIE que afectan a los animales silvestres

- **Enfermedades no listadas que afectan a los animales**
  - ✓ Agente causal de la caquexia crónica
  - ✓ Calicivirus de los mamíferos marinos
  - ✓ Calicivirus del síndrome de la liebre europea
  - ✓ Infección por virus de la influenza aviar levemente patógena
  - ✓ Infección por *Leptospira interogans* spp.
  - ✓ Infección por *Pasteurella* spp.
  - ✓ Infección por virus de encefalomiocarditis
  - ✓ Infección por *Babesia* spp. (nueva o de aparición inusual)
  - ✓ Infección por *Baylisascaris procyonis*
  - ✓ Infección por *Borrelia* spp.
  - ✓ Infección por circovirus
  - ✓ Infección por *Clostridium piliforme* (enfermedad de Tyzzer)
  - ✓ Infección por herpesvirus de elefantes
  - ✓ Infección por herpesvirus alcelafino tipo 1 (fiebre catarral maligna del ñu)
  - ✓ Infección por herpesvirus ovino tipo 2 (fiebre catarral maligna)
  - ✓ Infección por *Fasciola gigantica*
  - ✓ Infección por *Fascioloides magna*
  - ✓ Infección por filovirus
  - ✓ Infección por flavivirus (encefalitis transmitida por garrapatas)
  - ✓ Infección por flavivirus (encefalomielitis ovina)
  - ✓ Infección por *Geomyces destructans* (síndrome del hocico blanco de murciélagos)
  - ✓ Infección por hantavirus
  - ✓ Infección por henipavirus (hendra virus)
  - ✓ Infección por henipavirus (Nipah virus) en los murciélagos
  - ✓ Infección por *Histomonas* spp.
  - ✓ Infección por *Listeria monocytogenes*
  - ✓ Infección por morbillivirus en cánidos y felinos
  - ✓ Infección por morbillivirus en mamíferos marinos

- ✓ Infección por morbillivirus (sarampión)
- ✓ Infección por paramixovirus aviar (distintos a los de la lista de la OIE)
- ✓ Infección por parvovirus
- ✓ Infección por *Plasmodium* spp.
- ✓ Infección por *Psoroptes* spp.
- ✓ Infección por *Salmonella enterica* (todas las serovariedades)
- ✓ Infección por *Sarcoptes scabiei*
- ✓ Infección por *Theileria* spp. (nueva o de aparición inusual)
- ✓ Infección por *Toxoplasma gondii*
- ✓ Infección por *Trichomonas* spp. en aves y reptiles
- ✓ Infección por virus de fiebre amarilla
- ✓ Infección por virus de inmunodeficiencia (felina, simia)
- ✓ Infección por virus de leucemia felina
- ✓ Infección por virus de viruela (distintos a los de la lista de la OIE)
- ✓ Infección por *Yersinia enterolytica*
- ✓ Infección por *Yersinia pestis*
- ✓ Infección por *Yersinia pseudotuberculosis*

- **Reptiles**
  - ✓ Infección por poxvirus de los crocodilianos (papilomatosis de los cocodrilos)
  - ✓ Infección por fibropapilomatosis de las tortugas marinas Infección por *Trichinella nelsonei*, *T. zimbabwei* y *T. papouae*

- **Enfermedades no infecciosas**
  - ✓ Botulismo
  - ✓ Envenenamiento químico
  - ✓ Intoxicación por algas
  - ✓ Micotoxinas

- **Enfermedades de causa desconocida**
  - ✓ Eventos de morbilidad o mortalidad inusual

Anexo 3. Principales técnicas diagnósticas para su aplicación en fauna silvestre

(Fuente: adaptación de Jakob-Hoff *et al.*, 2014)

TÉCNICAS DE LABORATORIO Diagnóstico indirecto	Utilidad en silvestres	Sensibilidad
ELISA de competición	**Alta**	**Alta**
ELISA con proteína A o G	**Alta**	Moderada
Seroneutralización	**Alta**	Moderada
Inhibición de la hemaglutinación	**Alta**	Moderada
Fijación del complemento	**Alta**	Moderada
Inmunodifusión en gel de agar	**Alta**	Baja
Inmunofluorescencia directa	**Alta**	Moderada
ELISA indirecto	Baja	**Alta**
Inmunofluorescencia indirecta	Baja	**Alta**
Western blot	Baja	Moderada
Diagnóstico directo		
PCR en tiempo real	**Alta**	**Alta**
PCR Taqman	**Alta**	**Alta**
Cultivo bacteriano o fúngico	**Alta**	Moderada
Aislamiento vírico	**Alta**	Moderada
Necropsia, biopsia, citología	**Alta**	Variable
PCR convencional para agente ADN	**Alta**[1]	**Alta**
PCR convencional para agente ADN	**Alta**[1]	**Alta**
ELISA directo de captura	Moderada	**Alta**

[1]: en el caso en el que se pueda confirmar por secuenciación

Anexo 4. Aportaciones científicas relacionadas con la detección precoz y la vigilancia de enfermedades emergentes

Publicaciones científicas indexadas

- Rodríguez-Prieto, V., Vicente-Rubiano, M., Sánchez-Matamoros, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Hoinville, L., Vergne, T., Comin, A., Schauer, B., Dórea, F., Pfeiffer, D. U. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014). **Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations**. *Epidemiology and Infection*, doi 10.1017/S095026881400212X.

- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Martínez-Avilés, M., Sánchez-Matamoros, A. y Rodríguez-Prieto, V. (en revisión). **Emerging vector-borne diseases and any potential to prevent their spread**. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*.

- van den Doel, P. B., Rodríguez-Prieto, V., van Rossum-Fikkert, S., Schaftenaar, W., Latimer, E., Howard, L., Masters, N., Dastjerdi, A., Ling, P. D., Osterhaus, A. D. M. E. y Martina, B. (en revisión). **Seroprevalence of IgG antibodies to elephant endothelial herpes virus in captive Asian elephants in European and North American zoos**. *Veterinary Research*.

- Sánchez-Matamoros, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Rodríguez-Prieto, V., Iglesias, E. y Martínez-López, B. (en revisión). **Identification of suitable areas for African horse sickness virus infections in Spanish equidae populations**. *Transboundary and Emerging Diseases*.

Libro

- Martínez-López, B., Martínez Avilés, M., Iglesias Martín, I., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Matamoros, A., Fernández Calle, L. M., Fernández Salazar, M., González González, Y., Grau Vila, A., Marqués Prendes, S., Muñoz Reoyo, M. J., de la Torre Reoyo, A., Linares, F., Sánchez-Vizcaíno Buendía, F., Perez, A., López de Ayala, M., Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J. M. y Mínguez González, O. (2013). **Desarrollo de un sistema integral para la mejora de la vigilancia, control y gestión de enfermedades exóticas, emergentes y zoonósicas que afectan al sector ganadero en Castilla y León**. Ed. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. ISBN: 978-84-616-3244-2. 266 páginas.

Publicaciones científicas de divulgación

- Rodríguez, V. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **La situación de la lengua azul**. *Tierras Ovino* 2, 65-67.

Congresos

- Rodríguez, V., Rubio, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2009). **El papel de la fauna silvestre en las enfermedades emergentes**. Comunicación oral en el *VIII Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Veterinaria de la UCM, Madrid.
- Vázquez, M., Rodríguez, V., Mur, L., Martínez, B., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). **Evaluación de la rapidez y la calidad de la información contenida en las notificaciones oficiales de la OIE en los distintos países para enfermedades (re)emergentes**. Comunicación oral en el *XI Congreso de Ciencias Veterinarias*, Facultad de Odontología de la UCM, Madrid.
- Sánchez-Matamoros, A., Martínez-López, B., Rodríguez-Prieto, V., Iglesias, E. y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). **Identifying high risk areas for African horse sickness epidemics in Spain**. Comunicación oral en la *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM) Annual Meeting 2013*, Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid, Madrid.
- Rodríguez-Prieto, V., Vicente-Rubiano, M. y otros miembros del consorcio del RiskSur (2014). **Literature review of surveillance systems and approaches for the early detection of new, exotic and re-emerging diseases**. Comunicación oral en la *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM) Annual Meeting 2014*, Dublin Castle, Dublín (Irlanda).
- Dórea, F., Schauer, B., Rodríguez-Prieto, V., Lindberg, A. con el apoyo del consorcio del RiskSur (2014). **Multi-objective surveillance approaches: an inventory from 7 European countries**. Comunicación oral en la *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEPM) Annual Meeting 2014*, Dublin Castle, Dublín (Irlanda).
- Häsler, B., Rodríguez-Prieto, V. y otros miembros del consorcio del RiskSur (2014). **Mapping of surveillance and livestock systems, infrastructure, trade flows and decision-making processes to explore the potential of surveillance at a systems level**. Comunicación oral en la *2nd International Conference on Animal Health Surveillance (ICAHS)*, La Habana (Cuba).