



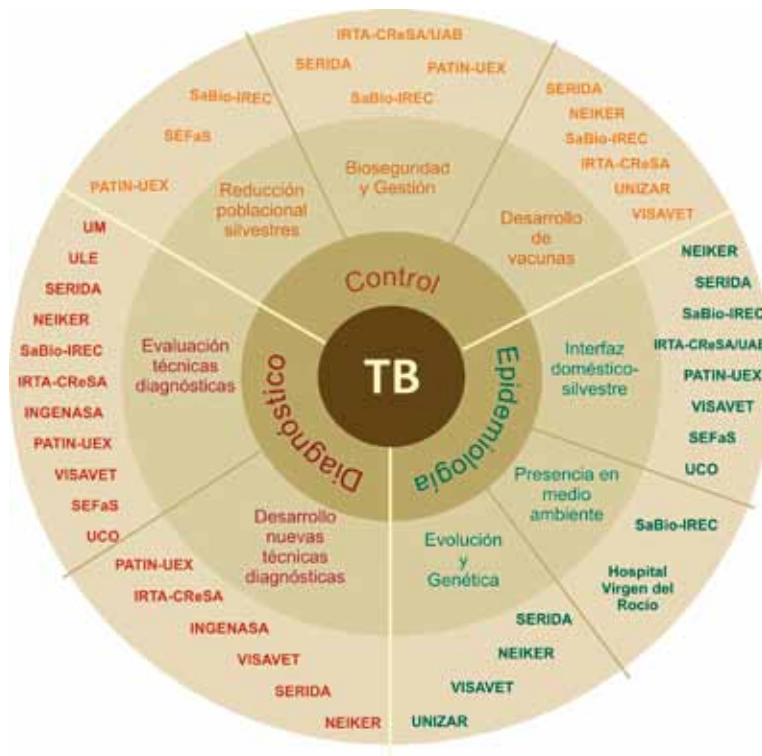
# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS: BASES PARA EL CONTROL

Ana Balseiro  
Bernat Pérez de Val  
Lucía de Juan  
Christian Gortázar



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

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



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

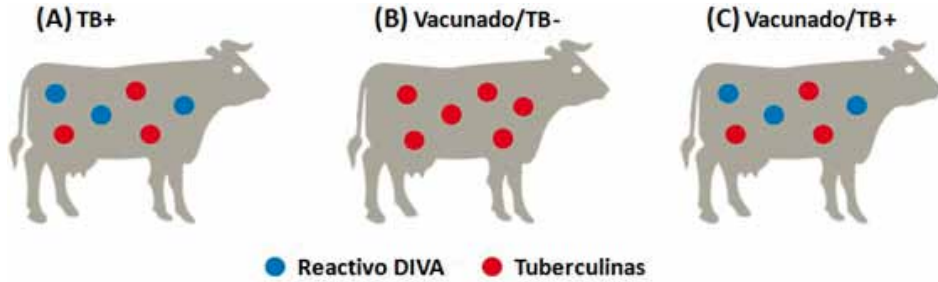
Tradicionalmente el control de la tuberculosis se ha basado en la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) y detección del  $\gamma$ -IFN, y el sacrificio de los animales positivos y/o a través de la vigilancia a nivel de matadero. Con esta sistemática se ha conseguido disminuir notablemente la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

### *Desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico*

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

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

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



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

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

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

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

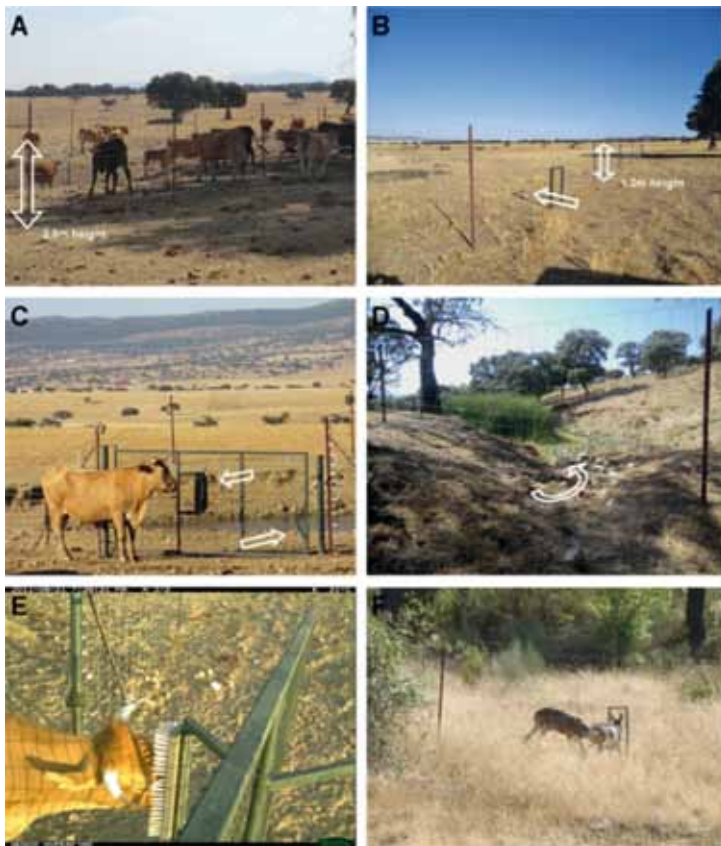
### Bioseguridad

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

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

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

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



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



## Vacunación

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

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

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

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



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

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

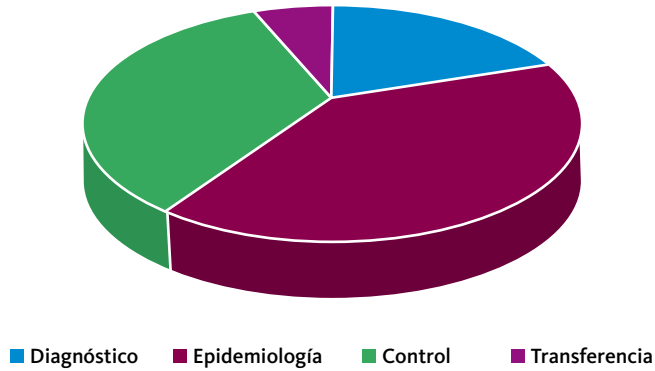
### **Investigando la tuberculosis animal:**

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

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



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



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

#### *Diagnóstico*

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

#### *Epidemiología*

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

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

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

### *Control*

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

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

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

### *Transferencia*

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

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

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

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