

Trabajo Fin de Máster

Evaluación del consumo de cebos vacunales por jabalí (*Sus scrofa*) mediante marcadores químicos en un ensayo de vacunación



Autora: Cristina Alonso Casado

Tutor académico: Christian Gortázar Schmidt

Línea de investigación en sanidad animal: enfermedades compartidas

**Máster universitario en investigación básica y aplicada a recursos
cinegéticos**



Instituto de investigación en recursos cinegéticos (IREC)



Universidad de Castilla La Mancha

Trabajo Fin de Máster

**Máster universitario en investigación básica y aplicada a
recursos cinegéticos**

**“Evaluación del consumo de cebos vacunales
por jabalí (*Sus scrofa*) mediante marcadores
químicos en un ensayo de vacunación”**

VºBº Christian Gortázar Schmidt

En Ciudad Real, a 28 de Noviembre de 2014

| | |
|--|----|
| Contenido | |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Problemática mundial y nacional: La Tuberculosis | 4 |
| Vacunación oral: | 7 |
| Marcadores:..... | 8 |
| Objetivos:..... | 11 |
| Material y métodos: | 13 |
| Trabajo de campo: | 13 |
| Distribución de los cebos en campo: | 15 |
| Esfuerzo vacunal: | 16 |
| Recogida de muestras:..... | 16 |
| Trabajo de laboratorio:..... | 16 |
| Marcadores químicos: | 16 |
| Extracción del marcador químico: | 17 |
| Análisis LC/MS..... | 17 |
| Análisis estadístico:..... | 18 |
| Resultados: | 19 |
| Evaluación de la cobertura vacunal alcanzada: | 19 |
| Presencia de etil-IPA y propil-IPA: | 20 |
| Resultados en función de las zonas de muestreo:..... | 21 |
| Especies no-diana: | 22 |
| Costes de producto y de análisis: | 22 |
| Discusión | 23 |
| Conclusión | 25 |
| Agradecimientos | 26 |
| Referencias: | 27 |

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad zoonótica, cuya problemática se extiende a nivel mundial. Han sido identificados reservorios tanto en animales domésticos como silvestres. La alta abundancia de jabalí (*Sus scrofa*) en España, identificado como principal reservorio, hace necesaria la aplicación de estrategias de control como la vacunación. Para poder cuantificar el consumo de cebos vacunales en condiciones de campo es necesario emplear marcadores. El objetivo de este estudio fue determinar los porcentajes de consumo de cebos, con dos tipos de marcador químico asociados a dos tipos de tratamiento, en jabalíes de la clase de edad diana tres clases de edad (rayones el grupo diana, subadultos y adultos) y en una especie no diana (zorro, *Vulpes vulpes*).

Este estudio se llevó a cabo en dos zonas de los Montes de Toledo seleccionadas según el tipo de manejo cinegético, más o menos intenso. Se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), un total de 185 muestras de jabalí y zorro, obtenidas en la temporada de caza, entre el 2012 y 2014.

Los resultados revelan que los porcentajes de consumo de cebos marcados, varían en función de la edad, especie y zona de muestreo. Se obtiene un porcentaje de consumo de un 83% en rayones, variando de un 33% a un 100% en función de las zonas de muestreo. Hay un cierto porcentaje de individuos que presentan ambos tipos de marcador en suero, incluida alguna de las muestras analizadas de especies no diana (zorros).

Podemos concluir que el uso de dos tipos de marcadores, en un ensayo de vacunación, nos permite conocer no sólo el porcentaje de animales que han consumido cebo, sino el tipo de tratamiento que han recibido en función de la zona y la edad. El uso de estos marcadores conlleva un alto gasto y elevado esfuerzo, lo que se sugiere la búsqueda de alternativas en el futuro.

Palabras clave: Ácido iofenólico, Cebo, jabalí, Marcador químico, Tuberculosis animal, Vacuna.

Introducción

El presente trabajo trata de la aplicación en fauna silvestre de dos marcadores químicos dentro de un ensayo de vacunación. La importancia de los reservorios silvestres en la epidemiología de la tuberculosis hace que la vacunación oral sea una de las estrategias clave en su control. El uso de distintos marcadores químicos, en el ámbito del estudio, hace posible conocer los animales que han sido tratados y qué tratamiento han recibido.

Problemática mundial y nacional: La Tuberculosis

La tuberculosis animal (TB) es una de las enfermedades zoonóticas que suponen un riesgo para la salud humana, cuya fuente de mantenimiento e infección son los animales. Además se asocia a pérdidas económicas en agricultura y ganadería, y compromete la conservación de la fauna, especialmente en algunas especies que están en peligro de extinción (Biet et al. 2005).

El principal agente etiológico de la TB es *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) y otros miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). *M. bovis* es un patógeno intracelular obligado con una gran permanencia en el ambiente y que posee un amplio rango de hospedadores, entre los cuales se engloba tanto a la fauna doméstica como la silvestre (Biet et al. 2005; Naranjo et al. 2007; Palmer et al. 2012).

Debido a la gran expansión de la enfermedad, y su problemática a nivel mundial, desde comienzos del siglo XX, diversos países implantaron estrategias de erradicación de TB en el ganado bovino. Se llevó a cabo el testado de animales infectados y su posterior sacrificio, además del control de movimientos, sobre todo en aquellos países con una baja prevalencia. La aplicación de estas estrategias conllevó un alto coste (Schiller et al. 2010).

En ciertos países, como Australia, la aplicación de estos métodos llevó a la erradicación de la enfermedad. Otros como Reino Unido, a pesar de que las prevalencias del

ganado disminuyesen, la enfermedad no fue erradicada. Por lo que se comenzó a pensar que quizás existiesen otras fuentes de infección que no se habían considerado (Waters et al. 2012). A partir de los datos anteriormente citados se comenzaron a hacer estudios en fauna silvestre, documentando su implicación en la epidemiología de la TB como reservorio. El búfalo africano (*Syncerus caffer*) en Sudáfrica, el tejón europeo (*Meles meles*) en Irlanda y Reino Unido, la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda o el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en EEUU (Fitzgerald y Kaneene 2013), son algunos ejemplos.

A mediados de los años 50 se inició, en el norte y centro de España, la lucha frente a la TB, mediante el testado del ganado bovino. Fue a finales del siglo XX (mediados de los 80) cuando se instauró el programa nacional de vigilancia y erradicación de la TB, incluyendo el aislamiento y sacrificio de los animales infectados y el control de los movimientos de ganado.

| CCAA | PREVALENCIA DE REBAÑO | | | | | | |
|-------------|-----------------------|-------|-------|------|------|------|------|
| | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |
| ANDALUCÍA | 4,15 | 5,80 | 8,94 | 8,54 | 6,16 | 5,69 | 5,94 |
| ARAGÓN | 3,65 | 0,75 | 0,7 | 1,22 | 1,62 | 1,38 | 0,71 |
| ASTURIAS | 0,24 | 0,22 | 0,21 | 0,18 | 0,14 | 0,19 | 0,2 |
| BALEARES | 0,21 | 0,00 | 0 | 0,17 | 0 | 0,4 | 0,6 |
| CANARIAS | 0,37 | 0,24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CANTABRIA | 2,25 | 1,57 | 0,91 | 0,79 | 0,74 | 0,89 | 0,88 |
| CLM | 9,51 | 11,62 | 10,27 | 7,11 | 5,35 | 3,54 | 3,33 |
| CYL | 4,16 | 3,71 | 2,75 | 2,62 | 2,57 | 2,66 | 2,88 |
| CATALUÑA | 1,08 | 0,85 | 0,83 | 0,59 | 0,81 | 0,25 | 0,04 |
| EXTREMADURA | 3,74 | 3,37 | 3,78 | 3,04 | 3,11 | 3,29 | 4,53 |
| GALICIA | 0,19 | 0,11 | 0,22 | 0,28 | 0,19 | 0,21 | 0,12 |
| LA RIOJA | 0,70 | 1,45 | 0,75 | 1,14 | 0,38 | 0,36 | 0,37 |
| MADRID | 3,41 | 5,72 | 5,54 | 5,45 | 7,22 | 6,13 | 4,51 |
| MURCIA | 8,05 | 3,29 | 3,51 | 1,59 | 0,33 | 1,4 | 1,84 |
| NAVARRA | 0,33 | 0,40 | 0,3 | 0,67 | 0,65 | 0,3 | 0,66 |
| PAÍS VASCO | 0,14 | 0,20 | 0,57 | 0,37 | 0,33 | 0,25 | 0,17 |
| VALENCIA | 1,14 | 1,41 | 1,38 | 3,84 | 1,94 | 1,55 | 2,88 |

Tabla 1. Tendencia temporal de las prevalencias en el ganado bovino, en las distintas comunidades autónomas. Se observa una evolución decreciente en la mayor parte, a excepción de Andalucía, Extremadura, Madrid y Valencia (Fuente: RASVE).

Según los datos de la tabla anterior, entre 2007 y 2010, Castilla La Mancha ha sido la comunidad autónoma más prevalente. En la actualidad es la 4ª después de Andalucía, Extremadura y Madrid.

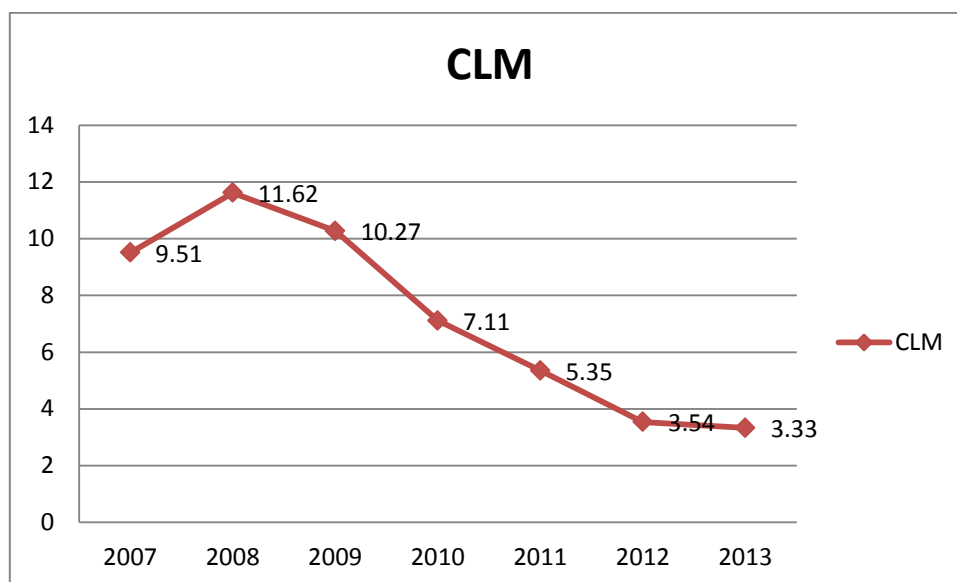
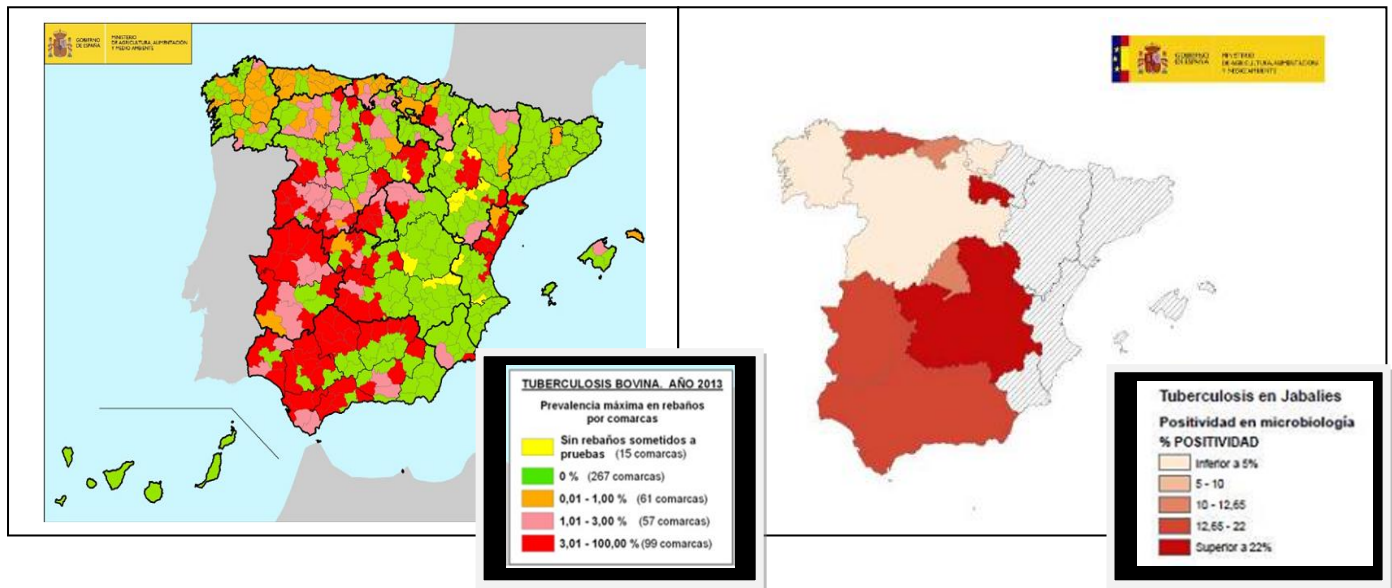


Gráfico 1. Tendencia temporal de las prevalencias de TB, en el ganado, en Castilla La Mancha. (Tabla 1, Fuente: RASVE).

Los informes anuales facilitados por la RASVE (siglas de: Red de Aleta Sanitaria Veterinaria), desde la implantación del plan nacional de vigilancia y erradicación de la TB, indican que la prevalencia se mantiene en la zona centro sur España. En zonas como en el norte y levante han disminuido. Debido a esto, se buscan otras fuentes de transmisión de la enfermedad. En estudios realizados sobre la distribución geográfica y tendencia temporal de la TB en fauna silvestre, se observaron altas tasas de prevalencia en el ciervo (*Cervus elaphus*; Vicente et al. 2006) y jabalí (*Sus scrofa*; Boadella et al. 2011).

La comparación de los mapas de prevalencia en fauna silvestre y en el ganado sugirió que la enfermedad podría estar compartida por ambos. Las mayores tasas de prevalencia coinciden en zonas donde la actividad cinegética es mayor.



Mapa 1. Mapas de prevalencia de TB en el ganado (izquierda) y del jabalí (derecha) en el año 2013.

(Fuente: RASVE Año 2013).

Son muchos los factores atribuibles a estas tasas de prevalencia. En el sur de España hay una alta densidad de ungulados silvestres sometidos a un manejo intensivo (aporte de alimento y agua, vallado cinegético y translocaciones), además de altas temperaturas y escasez de agua que provocan agregación. En el norte la actividad cinegética es mucho menor y no se realiza este tipo de manejos (Naranjo et al. 2008).

En la Península Ibérica, el jabalí ha sido identificado como principal reservorio silvestre de la TB (Cunha et al. 2012; Hermoso de Mendoza et al. 2006; Naranjo et al. 2008; Santos et al. 2009; Vieira Pinto et al. 2011).

Vacunación oral:

Se intenta controlar la enfermedad en fauna silvestre mediante la aplicación de diversas estrategias de control, siendo la vacunación un punto importante en su erradicación (Cross et al. 2007; Schiller et al. 2010).

Durante mucho tiempo la vacuna utilizada contra la TB en el ganado y en el hombre ha sido *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada. Se han realizado numerosos estudios para comprobar su eficacia en distintas especies y por diferentes vías de administración. Al mismo tiempo se están desarrollando y evaluando vacunas alternativas. A pesar de sus limitaciones, la BCG es la vacuna más utilizada en

los programas de control de la TB en fauna silvestre (Hope y Vordermeier 2005; Buddle et al. 2013).

En 2011 se testó la eficacia de un inmunoestimulador oral, basado en la inactivación por calor de *M. bovis*. Los resultados demostraron que el inmunoestimulador oral desencadenaba una respuesta inmune en el jabalí, cuya protección frente al patógeno estaba al nivel de la BCG (Garrido et al. 2011, Beltrán-Beck et al. 2014).

Uno de los primeros retos en la implantación de programas de vacunación oral en fauna silvestre es la distribución y aceptación de cebos. Se han probado muchas estrategias, todas ellas basadas en la ecología de la especie diana, como bolsitas impermeables clavadas en los árboles para zarigüeyas (Cross et al. 2009), cebos parcialmente enterrados para el control de TB en tejones (Delahay et al. 2003; Hughes et al. 1996) o la distribución masiva para el control de la rabia en zorros (Aubert et al. 1997; Slate et al. 2009). Existen consideraciones adicionales como la palatabilidad de los cebos, edad diana para consumo, y cobertura, entendida como el índice de consumo en la población diana. Otro de los retos es la eficacia vacunal, en la que existen consideraciones adicionales como dosis efectiva, edad de vacunación o viabilidad de la vacuna en el ambiente.

Para el desarrollo de la estrategia de vacunación en el jabalí, en ambientes mediterráneos, se diseñó un cebo de alta palatabilidad que permitiría la distribución de la vacuna, además de técnicas complementarias para la evaluación de su especificidad y los ratios de consumo (Ballesteros et al. 2009).

Marcadores:

Para la evaluación de estas estrategias de vacunación se utilizan los marcadores. Mediante su identificación y cuantificación en materiales orgánicos, o la producción de indicadores biológicos, nos permite conocer qué animales han consumido el cebo vacunal. Estos marcadores no sólo son utilizados en programas de vacunación, sino también para estima de poblaciones, estudios de fertilidad, control letal etc.

El marcador ideal es aquel que permita marcar sólo al animal objeto de estudio, sea evaluable por técnicas no invasivas, posea una larga permanencia en el organismo y

sea asequible (Ballesteros et al. 2013). Han sido muchos los marcadores utilizados en el pasado y en el presente pudiéndose estructurar en 5 categorías principales:

-Isótopos radioactivos: fueron utilizados para estudios de migración, estimas de población y de patología metabólica alrededor de los años 50 (Bailey et al. 1973; Dubrovsky et al. 1981; Karulin et al. 1974). Pueden ser identificados y cuantificados. Su persistencia es baja y provocan efectos deletéreos, lo que supone un límite para su utilización en campo.

-Isótopos estables: se detectan usando ratios de elementos como el carbono, nitrógeno e hidrógeno. Se utilizan para estudios de migración, procesos fisiológicos así como interacciones tróficas (Jones et al. 2014; Cerling et al. 2006), y pueden ser identificados a partir de muestras de sangre, pelo y dientes. Se consideran de larga duración, pero ésta depende del metabolismo del animal, por lo que resulta costoso e impredecible.

-Ácidos grasos: al igual que los isótopos estables, estos marcadores utilizan cambios en la dieta del animal para marcar. Los mamíferos no tienen la capacidad de metabolizar largas cadenas de ácidos grasos, por lo que la introducción de uno de ellos implica su posterior identificación en sangre, pelo y tejido adiposo (Fry y Dumbbar 2007).

-Marcadores físicos: son muchos los marcadores que se engloban en este apartado, los más utilizados son la rodamina B y la tetraciclina. La rodamina B es una sustancia xantínica inerte utilizada en la industria de la cosmética y farmacéutica. Produce efectos a corto plazo, siendo identificable en boca, heces, orina y posiblemente en sangre durante unos pocos días. A largo plazo produce bandas fluorescentes en tejidos de crecimiento como pelo, plumas y bigotes por luz ultravioleta. Es asequible y puede ser añadido a la alimentación, aunque tiene cierto riesgo de aversión. La rodamina B ha sido utilizada en muchos estudios y en distintas especies como en gatos asilvestrados (*Felis silvestris*), coyotes (*Canis Latrans*) o aves, obteniendo una eficacia similar variando ligeramente la permanencia según la especie (Fernandez et al. 2011; Ogilvie y Eason 1998; Purdey et al. 2003; Southey et al. 2002).

La tetraciclina es otro de los marcadores físicos, pero su identificación implica técnicas invasivas. Produce bandas fluorescentes en la pieza dentaria visibles por luz ultravioleta (parecida a la marca de la rodamina). A pesar de aportar datos importantes, ya que se puede observar el número de exposiciones si relacionamos los anillos de crecimiento y la intensidad de las bandas con el número y tiempo de exposición, tiene limitaciones. En animales adultos no es completamente visible por el escaso crecimiento dentario y en jóvenes a consecuencia de la remodelación dentaria. Además es un antibiótico, por lo que no se usa en animales que sean objeto de consumo (Algeo et al. 2013; Inoue et al. 2007; Johnston et al. 2005; Johnston et al. 1987; Robardet et al. 2012).

-Marcadores sistémicos: Son compuesto químicos que marcan los tejidos internos una vez que son ingeridos. Adquieren mayor relevancia el mírex y el ácido iofenóxico (IPA, siglas en inglés de Iophenoxic Acid) y sus derivados.

El mírex es un pesticida prohibido desde finales de 1970. Marca suero, sangre y tejido hepático pero tiene una gran persistencia en el ambiente y efectos carcinogénicos, por lo que se dejó de utilizar (Larson et al. 1981).

Los IPAs son los marcadores sistémicos más utilizados. Son ácidos orgánicos con un gran contenido en yodo. Fueron utilizados como medio de contraste radiológico en los años 50, pero dejaron de utilizarse en humanos por su alta persistencia en el organismo (alta afinidad con la albumina) y su interferencia en el diagnóstico de enfermedades del tiroides. Su baja toxicidad y alta persistencia hace que tenga un gran potencial como marcador en la fauna silvestre (Ballesteros et al. 2013). Al ingerirse produce un aumento de los niveles de yodo en sangre lo que sirve para su identificación (teniendo en cuenta la concentración basal de la especie) (Baer et al. 1985; Fisher y Marks 1997; King et al. 1998; Sweetapple y Nugent 1998). Hoy en día puede identificarse y cuantificarse mediante HPLC (siglas en inglés de High-Performance Liquid Chromatography, cromatografía líquida de alto rendimiento) (Ballesteros et al. 2010; Sage et al. 2013). Entre los IPAs más utilizados se encuentran el etil-IPA y sus derivados Metil- IPA y propil-iIPA (Ballesteros et al. 2013).

Muchos de estos marcadores han sido comparados y evaluados en fauna silvestre, por ejemplo en tejones (Cagnacci et al. 2006), en ratas negras (*Rattus rattus*; Tobin 1996), en el coyote (Knowlton et al. 1988) o en la cabra asilvestrada (*Capra hircus*; Eason y Batcheler 1991).

El Etil-IPA, después de ser evaluado como un buen marcador en jabalí por su eficacia a lo largo del tiempo (Massei et al. 2009), está siendo utilizado como una de las herramientas, en el desarrollo de la metodología, para la vacunación de tuberculosis en jabalí en España. A consecuencia de la necesidad de conocer si las estrategias diseñadas para la vacunación serían efectivas, en 2011 se llevó a cabo un estudio preliminar, cuyo objetivo principal era determinar los índices de consumo de los cebos en función de la edad. Se utilizaron jaulas selectivas para rayones (“rayoneras”) en cuatro zonas de Castilla La Mancha, donde hay una alta abundancia de jabalíes. Mediante la distribución de cebos marcados con etil-IPA y metil-IPA y su posterior análisis, se determinó que el índice máximo de consumo en rayones fue de un 72%, la mayor parte del consumo tuvo lugar en el interior de las rayoneras (Ballesteros et al. 2011).

Objetivos:

En el marco del primer ensayo de campo de vacunación oral de jabalíes para el control de la TB animal, se utilizan dos tipos de vacuna (BCG e inmunoestimulador inactivado por calor). Estos dos productos se administran a rayones de 3-4 meses de edad. Para poder monitorizar la cobertura de ambos tratamientos en condiciones de campo y para poder evaluar el efecto de cada uno, se utilizan dos marcadores químicos. En consecuencia, los objetivos del presente TFM son:

- Evaluar la cobertura vacunal (proporción de rayones que consumen cebos) mediante el uso de marcadores químicos (Etil-IPA y Propil-IPA).
- Discriminar los animales que han recibido un tipo de tratamiento u otro en base al derivado IPA detectado.
- Evaluar el consumo de cebos por jabalíes de otras clases de edad y por especies no diana (zorro).

- Discutir las ventajas e inconvenientes de la aplicación de marcadores en el marco de este proyecto.

Se plantea la hipótesis de que mediante la ampliación del área de estudio y el aumento del número de rayoneras, se conseguirá una mayor cobertura de vacunación selectiva (rayones), siendo capaces de superar el 72% obtenido en el estudio citado anteriormente (Ballesteros et al. 2011). Se postula además que el uso de un derivado específico para cada tipo de vacuna permitirá distinguir no sólo los animales que han recibido tratamiento sino el tipo de tratamiento recibido.

Material y métodos:

Trabajo de campo:

Zonas de estudio:

El estudio fue realizado en 2 zonas (1 y 2), seleccionadas según el tipo de manejo. La zona 1 presenta vallado cinegético y alimentación suplementaria (manejo más intensivo), la zona 2 es un espacio natural protegido y no está sometida a ese manejo (no alimentación suplementaria, vallado cinegético incompleto). Ambas zonas se dividieron en 2, cada una de ellas sujeta a un tipo de tratamiento (zona 1= A y B, Zona 2= C y D). En la zona 1 existe una separación física entre fincas a diferencia de la zona 2 donde la separación es la zona de raña entre solana y umbría (mayor permeabilidad). Ambas zonas pertenecen a Montes de Toledo, donde hay una alta actividad cinegética y una elevada abundancia de jabalí.

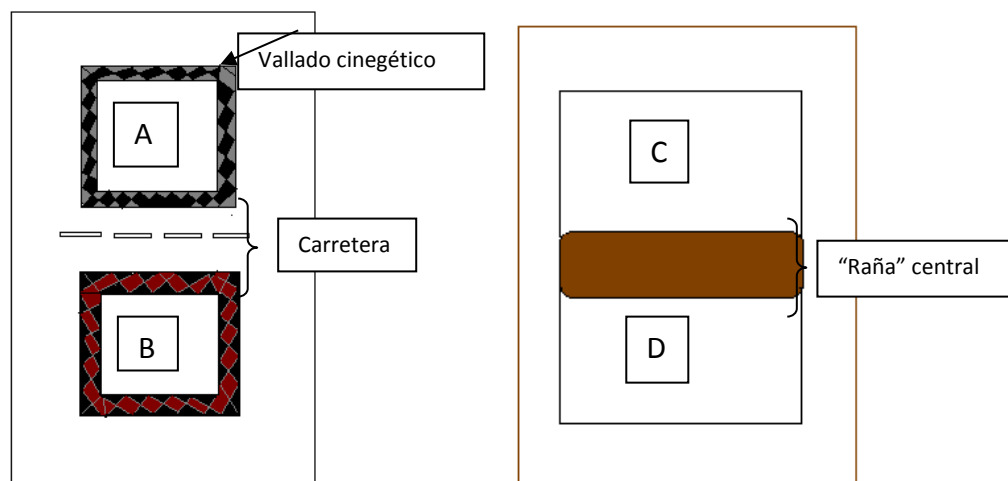


Figura 1. Las fincas de vacunación A y B se encuentran valladas y separadas por una carretera. Las fincas C y D están separadas por una barrera natural.

En las zonas A y B se marcaron 10 puntos de distribución y en las zonas C y D 14 puntos, respectivamente. En cada punto marcado se colocan dos rayoneras separadas entre ellas 100 m. Las rayoneras se colocan cerca de puntos de agua permanentes.



Figura 2. Las rayoneras son jaulas de metal de forma triangular. Sus dimensiones permiten la entrada sólo de rayones de no más de 5 meses. Cada rayonera está cubierta por una malla verde, que proporciona sombra, evitando así la pérdida de efectividad de la vacuna por el calor (Ballesteros et al. 2010).

| Zonas | Área | Nº rayoneras | Nº de cebos /día de vacunación | Marcador utilizado | Vacuna |
|-------|---------|--------------|--------------------------------|--------------------|------------------------|
| A | 1400 HA | 20 | 20 | Etil-IPA | Inmunoestimulador oral |
| B | 1600HA | 20 | 20 | Propil-IPA | BCG |
| C | 3200HA | 28 | 20 | Etil-IPA | Inmunoestimulador oral |
| D | 2900HA | 28 | 20 | Propil-IPA | BCG |

Tabla 2. Área de las zonas del ensayo, distribución de rayoneras y cebos, y marcador utilizado asociado a cada tipo de vacuna.

Cebos vacunales:

Los cebos usados en el estudio se elaboraron a partir de pienso de rayón, harina, azúcar, parafina y aroma de canela (Ballesteros et al 2009a). En su interior se coloca un vial de 0,2 ml con la vacuna.

Se administran dos tipos de vacuna (BCG e inmunoestimulador oral inactivado) cada una de ellas asociada a un marcador químico diferente.



Figura 3. Cebos usados para la distribución de la vacuna en campo (ballesteros et al. 2009)

Tras la elaboración de los cebos, se procede a su marcado. El IPA fue diluido en etanol a una concentración de 80 mg/ml, se administró 0,5 ml por cebo.

Distribución de los cebos en campo:

El estudio va enfocado a la vacunación selectiva de rayones, por lo que su distribución se realiza en función de la ecología de la especie. La lactancia de los rayones finaliza sobre los meses de verano, siendo esta la época idónea para su distribución. La vacunación se realiza al atardecer, cuando hay una mayor actividad en campo y las temperaturas disminuyen, lo que evita pérdidas en la viabilidad de la vacuna BCG por el calor.

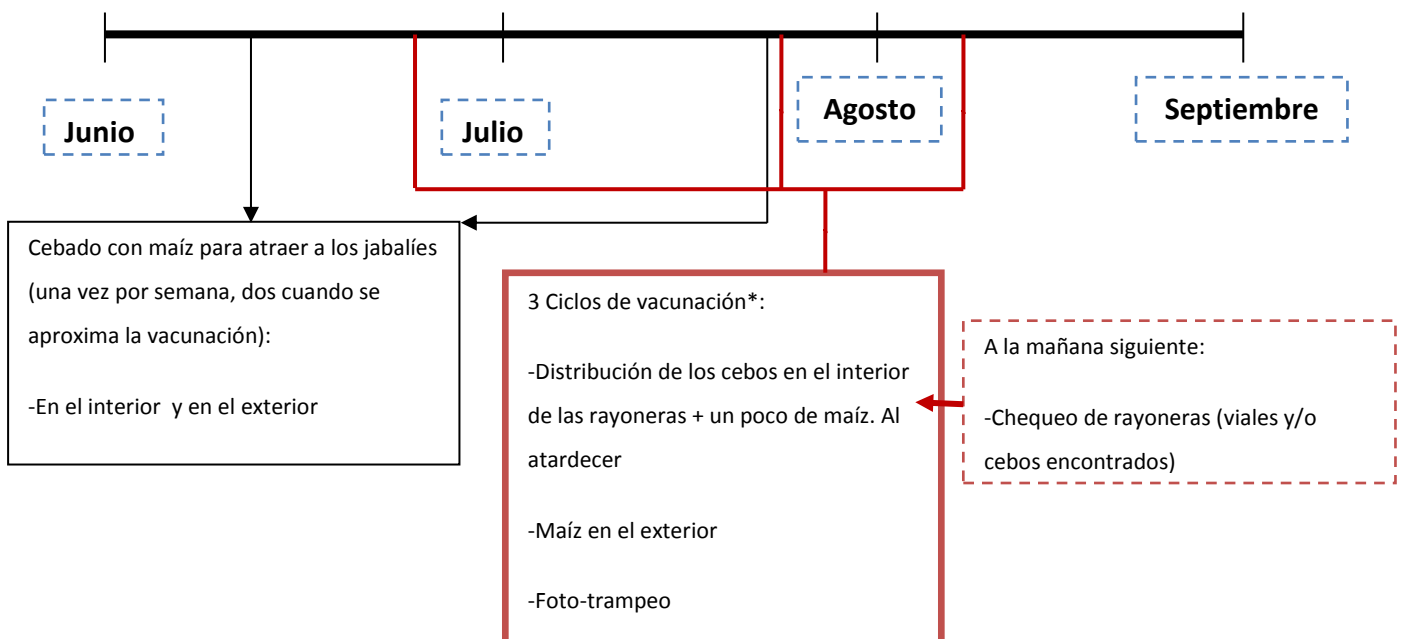


Figura 4. Diagrama del proceso de vacunación en campo.

Esfuerzo vacunal:

El área de estudio, en este ensayo de vacunación, se ha ampliado en comparación con el área estudiada en 2011 por Ballesteros. La superficie total tratada actualmente es próxima a las 10.000Ha. El número de rayoneras también aumenta, pasando de 4-6 a 20-28, aumentando el esfuerzo vacunal. Se intenta conseguir con ello, un mayor índice de consumo y por tanto una mayor cobertura vacunal. Además, en el estudio de Ballesteros et al. (2011) se utilizaron sólo 2 semanas de distribución de cebos, frente a las 3 utilizadas en la actualidad.

Recogida de muestras:

Para nuestro estudio se utilizó un total de 183 muestras de suero, 180 de jabalí de las temporadas 2012-2013 y 2013-2014, recolectadas en la época de montería (Octubre-Febrero), y 3 de zorro (*Vulpes vulpes*) hallados muertos en 2014. De las 180 muestras de jabalí, 45 pertenecen a la zona A, 17 a la zona B, 54 a la zona D y 64 a la zona C. Como blanco se utilizó un pool de sueros (3 ml) recolectados en época de montería, de fincas que no están sujetas al ensayo de vacunación.

Trabajo de laboratorio:**Marcadores químicos:**

En este estudio se utilizaron como marcadores químicos el Etil-IPA y el Propil-IPA, y como estándar interno Butil-IPA. Los IPAs (Etil-IPA, Propil-IPA y Butil-IPA) se adquirieron en PCR euroCHEM Ltd. (Cork, Irlanda).

Uno de los principales inconvenientes es su precio como producto (Etil-IPA 30,32 € por gr y Propil-IPA por 37,56 € por gr), así como el coste del análisis mediante cromatografía.

Extracción del marcador químico:

El método utilizado en la extracción de los IPA a partir del suero es el descrito por Ballesteros (Ballesteros et al. 2010). Se realizó siguiendo estos pasos:

| | |
|----------------|---|
| 1º Paso | 100 µl suero+630 µl de acetonitrilo+20 µl de Butil-IPA+0,2 ml tungstato+0,2ml de ácido sulfúrico 0.33M. |
| 2º Paso | Vortear durante 10 minutos |
| 3º Paso | Enfriar -20°C 20 minutos |
| 4º Paso | Centrifugar 5000g a -4° durante 10 minutos |
| 5º Paso | Transferir la fase superior al vial LC/MS |

Tabla 3. Esquema del método de extracción de IPA en las muestras de suero.

Análisis LC/MS

El sistema analítico usado en nuestro estudio es el Agilent 1100 series y Agilent 6110 cuádruple LC/MS con una fuente multimodal. El método cromatográfico utilizado fue el desarrollado por Ballesteros (Ballesteros et al. 2010) con algunas modificaciones.

La cromatografía líquida se utiliza para separar los componentes de una mezcla. Consta de una columna (fase estacionaria no polar) y una fase móvil que actúa portando la muestra. Los componentes de nuestra mezcla emigran de acuerdo a las interacciones que se producen con la columna, determinando su separación y su tiempo de elución. La columna utilizada fue una Waters Spherisorb ODS 2 columnas de 5µm 4,6 mmx250mm con una precolumna de 10 mm (Waters Corporation, MA, USA).

Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes:

| Tiempo | Solvente B (Tampón ACH) | Solvente C (Tampón ACN) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 75 | 25 |
| 3 | 40 | 60 |
| 10 | 0 | 100 |
| 12 | 0 | 100 |
| 16 | 75 | 25 |
| 18 | 75 | 25 |

Tabla 4. Las condiciones de cromatografía consisten en el gradiente de elución de dos solventes tampón acetonitrilo y tampón ácido acético.

El volumen de inyección de la maquina es de 50 μ l y el flujo de la columna es de 0.900ml/minuto. Se utilizó una monitorización de iones de polaridad negativa para la detección de los IPA.

Para la detección de los IPA se utilizó una monitorización de iones negativos con los siguientes ajustes de fuentes (MM-ESI):

Condiciones de la cámara de pulverización:

| | |
|------------------------------------|----------|
| Temperatura del gas | 250°C |
| Temperatura del vaporizador | 100°C |
| Flujo de gas seco | 5 l /min |
| Presión del nebulizador | 40psig |
| Voltaje de capilaridad | 2000V |
| Voltaje de carga | 1000V |

Tabla 5. Condiciones de la cámara de pulverización siguiendo la técnica descrita por Ballesteros et al. 2009 con algunas modificaciones por fallos en la detección de los IPA.

Los iones monitorizados se muestran en la siguiente tabla:

| Compuestos | Iones padre | Iones hijo |
|-------------------|--------------------|-------------------|
| Etil-IPA | 570.9(15.34) | 442.8(100) |
| Propil-IPA | 584.9 (16.20) | 456.9(100) |
| Butil-IPA | 598.9(19.40) | 470.8(100) |

Tabla 6. Iones padres e hijos utilizados en la cuantificación y detección de los IPA.

Para la identificación de los componentes se utilizaron los iones padre, mientras que para la cuantificación de los componentes se utilizaron los iones hijo. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa LC/MS ChemStation B.03.02.

Análisis estadístico:

Se obtienen los porcentajes de consumo de cebo total, consumo por marcador químico y consumo por marcador químico en función de la edad, mediante un análisis de frecuencias (cantidad mínima de marcador químico que ha de encontrarse en suero, para determinar el consumo de cebo).

Se analiza la asociación existente entre la edad y el consumo de cebo mediante una tabla de contingencia y un análisis de chi cuadrado. Para el análisis de relación entre el consumo de cebo y la zona de muestreo se realiza la prueba de U de Mann-Whitney.

El programa utilizado en los análisis estadísticos es IBM SPSS Statistics 20.

Resultados:

Evaluación de la cobertura vacunal alcanzada:

Para evaluar la cobertura vacunal en rayones, es decir, la proporción de estos que consumen cebos se testaron un total de 180 muestras de jabalí de las cuales 177 fueron leídas en cromatografía (3 de ellas dieron error). Definimos una muestra como positiva si se detecta presencia de cualquiera de los derivados IPA ya que supera el límite detección (cantidad mínima necesaria del marcador para ser detectado por cromatografía), de cualquiera de los derivados IPA.

La cobertura vacunal alcanzada en rayones así como en edades no diana se muestra en la Tabla 1.

| | n | Muestras + totales | %Muestras + totales | IC 95% |
|-------------------|-----|-----------------------|------------------------|---------------|
| Rayones | 28 | 23 | 82,1% | 68,1- 96,2 |
| Subadultos | 40 | 23 | 57,5% | 42,2- 72,8 |
| Adultos | 107 | 61 | 57% | 47,7- 66,3 |

Tabla 7. Se muestra el porcentaje de muestras positivas al consumo de marcador

La presencia del marcador en sangre difiere significativamente en función de la clase de edad ($\chi^2=6,15$ $p=0,046$). Siendo mucho mayor en el caso de los rayones que en los subadultos o adultos (clase 2 $\chi^2=13,33$ $p=0,00$; clase 3 $\chi^2=0,900$ $p=0,343$; clase 4 $\chi^2=2,103$ $p=0,147$).

Presencia de etil-IPA y propil-IPA:

Si desglosamos los anteriores resultados según tipo de biomarcador detectado y clase de edad. Hemos de definir el concepto de doble positivo (muestra positiva a la presencia de dos biomarcadores) y de marcador no correspondiente (presencia del marcador no asociado a la zona). Del total de las muestras positivas a IPA, 85 muestras presentan etil-IPA, un 77,98%, 48 muestras son positivas a propil-IPA, un 44,03% y para ambos marcadores 24 muestras, 21,81%.

Los resultados obtenidos, para las 28 muestras de rayones, en función de las zonas de muestreo son los siguientes:

| | Muestras analizadas | Muestras + totales | %Muestras + totales | +Etil-IPA | %Etil-IPA | +Propil-IPA | %Propil-IPA | +Ambos | %Ambos |
|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------|--------|
| A(Etil-IPA) | 8 | 8 | 100% | 7 | 87,5% | 3 | 37,5% | 3 | 37,5% |
| B(Propil-IPA) | 7 | 6 | 85,71% | 1 | 16,66% | 6 | 100% | 1 | 16,66% |
| C(Etil-IPA) | 12 | 10 | 83,33% | 10 | 100% | 5 | 50% | 5 | 50% |
| D(Propil-IPA) | 1 | 1 | 100% | 1 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% |

Tabla 8. Se muestran los porcentajes de positivos de rayones en función de la zona de muestreo, los porcentajes marcados son aquellos marcadores que no se corresponden al marcador administrado en esa zona.

Para las 40 muestras de subadultos:

| | Muestras analizadas | Muestras + totales | %muestras + totales | +Etil-IPA | % Etil-IPA | +Propil-IPA | %Propil-IPA | +Ambos | %Ambos |
|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------|------------|-------------|-------------|--------|--------|
| A(Etil-IPA) | 11 | 6 | 54,54% | 4 | 66,66% | 3 | 50% | 1% | 16,66% |
| B(Propil-IPA) | 3 | 1 | 33,33% | 0 | 0% | 1 | 100% | 0 | 0% |
| C(Etil-IPA) | 18 | 12 | 66,66% | 12 | 100% | 4 | 33,33% | 4 | 33,33% |
| D(Propil-IPA) | 8 | 4 | 50% | 2 | 50% | 3 | 75% | 1 | 25% |

Tabla 9. Porcentaje de subadultos en función de las zonas de muestreo, se marca aquellos porcentajes de positivos al marcador que no corresponde con el administrado.

Para las 107 muestras de adultos:

| | Muestras analizadas | Muestras + totales | %Muestras + totales | +Etil- IPA | % Etil- IPA | +Propil- IPA | %Propil- IPA | +Ambos | %Ambos |
|---------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------|--------|
| A(Etil-IPA) | 26 | 19 | 73,07% | 18 | 94,73% | 1 | 5,26% | 0 | 0% |
| B(Propil-IPA) | 5 | 4 | 80% | 1 | 25% | 3 | 75% | 0 | 0% |
| C(Etil-IPA) | 33 | 18 | 54,54% | 16 | 88,88% | 8 | 44,44% | 6 | 33,33% |
| D(Propil-IPA) | 43 | 20 | 46,5% | 13 | 65% | 10 | 50% | 3 | 15% |

Tabla 10. Porcentaje de adultos en función de las zonas de muestreo, se marcan aquellos positivos al marcador que no corresponde con el administrado.

Resultados en función de las zonas de muestreo:

Los resultados obtenidos para la edad diana en función de las zonas de muestreo, clasificadas en función del manejo, son los siguientes:

| | n | Muestras + | %Muestras + | IC95% |
|----------------|----|------------|-------------|----------|
| Zona 1 (A y B) | 13 | 12 | 92,3% | 77,9-100 |
| Zona 2 (C y D) | 15 | 11 | 73.3% | 51-95.6 |

Tabla 11. Porcentajes de positivos a marcador de todas las muestras analizadas, clasificadas según el tipo de manejo. Zona 1, manejo cinagético y zona 2 libre de él (rayones).

No hay diferencias significativas en cuanto a la presencia de biomarcador atribuibles al manejo (Z: 1.284, $p > 0.05$).

Sin embargo si hacemos este mismo análisis en global (frecuencias mostradas en la Tabla 12) se detectan diferencias significativas según manejo (Z: 2.148, $p < 0,05$).

| | n | Muestras + | %Muestras + | IC95% |
|---------------------------|-----|---------------|----------------|-----------|
| Zona 1 (A y B) | 58 | 42 | 72.4 | 60,9-83,9 |
| Zona 2 (C y D) | 117 | 65 | 55.5 | 46,5-64,5 |

Tabla 12. Porcentajes de positivos a marcador de todas las muestras analizadas, clasificadas según el tipo de manejo. Zona 1, manejo cinagético y zona 2 libre de él.

Especies no-diana:

De los 3 zorros analizados solo uno es positivo (33,3%; IC95% = 0- 86,5).

Costes de producto y de análisis:

El coste del producto en función del tipo de marcador químico es de 30,32€ por gramo en el etil-IPA y de 37,56 por gramo de propil-IPA. El coste por temporada de vacunación y por zona, se muestra en la siguiente tabla:

| | A (Etil-IPA) | B (Propil-IPA) | C(Etil-IPA) | D(Propil-IPA) |
|----------------------------------|---------------|----------------|--------------|---------------|
| 1 ciclo de vacunación | 1303,76 euros | 1615,08 euros | 1819,2 euros | 2253,6 euros |
| Temporada completa | 3911,28 euros | 4845,24 euros | 5457,6 euros | 6760,8 euros |

Tabla 13. Coste por zona y marcador utilizado, en un ciclo de vacunación y en la temporada completa.

Unificando los datos se obtiene que el coste total por ciclo de vacunación es de 6991,64 euros. El coste total de la temporada de vacunación es de 20.974,92 euros.

El coste del análisis es alto, tanto por la utilización del HPLC como la costosa mano de obra.

Discusión

La vacunación es una de las estrategias de control de la TB en fauna silvestre, llevada a cabo en multitud de países (Cross et al. 2007). Una de las herramientas usadas para su evaluación en campo, han sido los marcadores. En este estudio se ha analizado la eficacia de los IPAs, como marcadores en un ensayo de vacunación selectiva en campo. Mediante este análisis, se determina el porcentaje de muestras positivas al consumo de cebos marcados, en 3 clases de edad (rayones, subadultos y adultos). Se demostró que la cobertura vacunal selectiva, (% de rayones que consumen cebos) es mayor aumentando el esfuerzo vacunal (ampliación del área de estudio, distribución de más rayoneras y aumento de los ciclos de vacunación), obteniendo un 83% de consumo, frente al 72% obtenido por Ballesteros en el 2011 (Ballesteros et al. 2011). Por consiguiente, se acepta la hipótesis de partida.

Se postulaba además que el uso de un derivado específico para cada tipo de vacuna permitiría distinguir no sólo los animales que han recibido tratamiento, sino el tipo de tratamiento recibido. En efecto, los marcadores han permitido distinguir no sólo los animales diana (rayones de jabalí) que han sido tratados, sino qué tipo de tratamiento han recibido. Se obtuvo que un 82% de los rayones, muestreados en zonas con vacunación IV (inmunoestimulador oral inactivo), consumió cebos marcados con Etil-IPA, mientras que un 60% de los rayones muestreados en zonas con vacunación BCG, consumió cebos marcados con propil-IPA.

En base a los resultados obtenidos, se puede decir además que, a pesar de ser una vacunación selectiva dirigida a rayones, gran parte de los subadultos y adultos muestreados son positivos al consumo de cebos marcados. En el caso de los subadultos, se debe tener en cuenta que pueden ser individuos que consumieron cebos en el primer año de vacunación (permanencia de al menos 18 meses en suero; Ballesteros et al. 2013), o bien a la posible bioacumulación y biomagnificación del compuesto (consumo de cebos en el primer año + consumo de cebos en el segundo año). Los resultados obtenidos en los adultos, sugieren que de algún modo, han tenido acceso a los cebos. Puede ser que otras especies no diana, o incluso rayones, han sacado cebos al exterior o bien, algunos adultos han tenido acceso al interior de las rayoneras, como ya explicó ballesteros en su estudio del 2011. Todo esto demuestra

que el uso de dos tipos de marcadores químicos nos permite evaluar el consumo de cebos por diferentes clases de edad.

En los resultados obtenidos, en función de las zonas de muestreo, se observa variaciones en el consumo de cebos marcados, por edad (Tablas 8,9 y 10).

Los resultados estadísticos obtenidos sugieren que no hay diferencia alguna para la clase edad rayones, en cuanto al consumo de cebos en zonas con manejo cinegético que libres de él. En el análisis global de todas las muestras, los resultados muestran que si hay un mayor consumo en zonas con manejo cinegético, lo que sugiere que adultos y subadultos consumen, en estas zonas, más cebos por acostumbramiento.

En el análisis de los marcadores, se observó que hay individuos que presentan ambos tipos de marcadores. Esto sugiere que hay movimiento de animales de unas zonas a otras. El porcentaje de marcador que no se corresponde con el administrado es mayor en la zona 2 (C y D), que en la zona 1 (A y B). En la zona 2 las áreas están separadas por una barrera natural y no un vallado cinegético. Por el contrario en la zona 1, en la que hay un vallado cinegético y las áreas están separadas por una carretera, es más probable que haya habido errores en la distribución en campo, en la administración del marcador en los cebos, en el análisis HPLC o bien haya corredores que permitan cierto contacto entre ambas zonas.

Se demostró que otras especies, no diana, han consumido cebos marcados con etil y propil-IPA. Se analizaron muestras de especies no diana (zorros), en una de las cuales se observó la presencia de un tipo de marcador en sur. Lo que indica la presencia de estos individuos en ambas zonas y la posibilidad de que estos saquen de la rayonera cebos, que pueden ser consumidos por subadultos o adultos.

Mediante la cromatografía, no sólo se puede identificar el marcador sino también cuantificarlo. A pesar de esto, no se puede relacionar la cuantificación del marcador con el número de cebos consumidos. Hay factores como la posible bioacumulación y biomagnificación del compuesto, en el organismo, en los 2 años de vacunación, o como la fuerte variación del peso vivo y del engrasamiento con la edad. Del mismo modo no se puede diferenciar en qué ciclo han consumido el cebo.

Se ha demostrado que los derivados IPA tienen una Los resultados que aporta su uso, son efectivos e interesantes. Estos datos pueden ser relacionados posteriormente con otros análisis realizados en este ensayo de vacunación, permitiendo evaluar la eficacia vacunal en condiciones de campo.

En este estudio se ha demostrado que el uso de los IPAs es práctico, ya que poseen una alta permanencia en el organismo (> 18 meses), son fácilmente administrables en el cebo y no provocan aversión. Además aportan información clave: porcentaje de individuos que han consumido cebos marcados y discriminar tipo de tratamiento que han recibido. A pesar de todas las ventajas que tiene su uso, el precio que conlleva es demasiado elevado como para una utilización continua. Se puede observar que el precio es de 21000 euros aproximadamente, en sólo una temporada de vacunación (Tabla 13).

Conclusión

1. Al aumentar el esfuerzo vacunal, se aumenta la cobertura vacunal , consiguiendo un índice de consumo de rayones mayor que en el estudio de Ballesteros, en el 2011.
2. Hay un mayor porcentaje de rayones que han consumido cebos con vacuna IV (marcados con etil-IPA), que con vacuna BCG (marcados con propil-IPA).
3. El consumo de cebos es mayor en zonas con manejo cinegético que libres de él, siendo mayor en los rayones que en subadultos y adultos.
4. La mayor parte de subadultos y adultos muestreados han consumido cebos marcados, a pesar de ser una vacunación selectiva. Hay presencia de consumo de ambos tipos de marcador en especies no diana (zorros).
5. Debido al movimiento de animales de unas áreas a otras o bien por errores en la administración, en el análisis o en la detección, hay individuos que han consumido los dos tipos de cebos marcados.
6. El uso de los IPAs como marcadores conlleva un alto coste por la adquisición del producto y esfuerzo por su análisis. Se sugiere la búsqueda de alternativas,

bien el uso de otros marcadores de la misma eficacia y más asequibles, o dejar de utilizar estos marcadores en el futuro.

En este estudio se ha demostrado la efectividad del uso de los IPAs como marcadores, en un ensayo de vacunación en campo. Nos permite conocer el porcentaje de individuos que han consumido cebos marcados, discriminarlos por edad y zona de muestreo, incluso nos permite conocer el tipo de tratamiento que han recibido.

Agradecimientos

Este estudio se engloba dentro de un proyecto de vacunación en jabalí en España, llevado a cabo por la investigadora predoctoral Iratxe Díez Delgado, a quien agradezco la posibilidad de elaboración de este trabajo, así como la ayuda incondicional que me ha brindado en su proceso de elaboración. A mi tutor Christian Gortázar Schmidt por haberme guiado en la elaboración de mi estudio.

A Rafael Mateo y sobre todo a Pablo Camarero por su ayuda en el laboratorio y por tener una paciencia enorme con mis básicos conocimientos de química.

Referencias:

1. Aubert, M., Bruyere-Nesson, V., Vuillaume, P.(1997) "Oral vaccination of foxes in France: Evaluation of bait delivery systems". *Rabies Control in Asia* 35-40.
2. Algeo, T. P., Norhenberg, G., Hale, R., Montoney, A., Chipman, R. B., Slate, D.(2013)"Oral rabies vaccination variation in tetracycline biomarking among ohio raccoons" *Journal of Wildlife Diseases* 49(2): 332-337.
3. Baer, G. M., Shaddock, J. H., Hayes, D. J., Savarie, P.(1985) "Iophenoxic acid as a serum marker in carnivores" *Journal of Wildlife Management* 49(1): 49-51.
4. Bailey, G. N. A., Linn, I. J., Walker, P. J. (1973) "Radioactive marking of small mammals". *Mammal Rev* 3(1): 11-23.
5. Ballesteros, C., Sage, M., Fisher, P., Massei, G., Mateo, R., De La Fuente, J., Rossi, S., Gortázar, C.(2013) "Iophenoxic acid as a bait marker for wild mammals: Efficacy and safety considerations". *Mammal Review* 43(2): 156-166.
6. Ballesteros, C., Vicente, J., Carrasco-García, R., Mateo, R., De la Fuede, j., Gortázar, C. (2011)"Specificity and success of oral-bait delivery to Eurasian wild boar in Mediterranean woodlands hábitats. *Journal wildlife research* 57:749-757.
7. Ballesteros, C., Gortázar, C., Canales, M., Vicente, J., Lasagna, A., Gamarra, J.A., Carrasco-García, R., De la Fuentes, J. (2009) "Evaluation of baits for oral vaccination of European wild boar piglets". *Research in Veterinary Science* 86: 388-393.
8. Beltrán-Beck B, de la Fuente J, Garrido JM, Aranaz A, Sevilla I, et al. (2014) "Oral Vaccination with Heat Inactivated Mycobacterium bovis Activates the Complement System to Protect against Tuberculosis". *PLoS ONE* 9(5)e98048. doi:10.1371/journal.pone.0098048
9. -Biet, F., Boschioli, M. L., Thorel, M. F., Guilloteau, L. A. (2005) "Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC)". *Vet Res* 36 (3): 411-436.
10. -Boadella, M., Acevedo, P., Vicente, J., Mentaberre, G., Balseiro, A., Arnal, M., Martínez, D., García-Bocanegra, I., Casal,C., Álvarez, J., Oleaga, A., Lavín, S., Muñoz, M., Sáez-Llorente, J.L, De la Fuente, J., Gortázar, C. (2011) "Spatio-Temporal Trends of Iberian Wild Boar Contact with Mycobacterium tuberculosis Complex Detected by ELISA". *Ecohealth* 8: 478-484.Cagnacci, F., Massei, G., Coats, J., de Leeuw, A., Cowan, D. P.(2006)" Long-lasting systemic bait markers for Eurasian badgers". *Journal of Wildlife Diseases* 42(4): 892-896.
11. Buddle, B.M, Parlane, N.A., Wedlock, D.N., Heiser, A. (2013) "Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans". *Transboundary and emerging diseases* 60 suppl 1: 136-46.
12. Cerling, T.E., Wittemyer, G., Rasmussen, H.B., Vollrath, F., Cerling, C.E., Robinson, T.J., Douglas-Hamilton, I. (2006) " Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes". *Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America* 103(2): 371-3.

13. Cross, M. L., Buddle, B. M., Aldwell, F. E. (2007) "The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species". *Veterinary Journal* 174(3): 472-480.
14. Cross, M. L., Henderson, R. J., Lambeth, M. R., Buddle, B. M., Aldwell, F. E. (2009) "Lipid-formulated BCG as an oral-bait vaccine for tuberculosis: Vaccine stability, efficacy, and palatability to brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand". *Journal of Wildlife Diseases* 45(3): 754-765.
15. Cunha, M.V., Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J.R., Aranha, J.M., Vieira-Pinto, M., Botelho, A. (2012) "Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: A molecular epidemiology perspective". *Research in veterinary science* 92(2): 225-235.
16. Delahay, R. J., Wilson, G. J., Smith, G. C., Cheeseman, C. L. (2003) "Vaccinating badgers (*Meles meles*) against *Mycobacterium bovis*: the ecological considerations". *Veterinary journal* 166(1): 43-51.
17. Dubrovsky, Y. A., Okhotsky, Y. V., Karulin, B. E., Kulik, I. L., Bokshtein, F. M., Nikolaeva, G. M., Ovchinnikov, I. M., Vinokurova, N. S. (1981) "Field experience of marking sand flies with radioactive isotopes introduced from great gerbils". *Zoologichesky Zhurnal* 60(5): 764-770.
18. Eason, C. T., Batcheler, D. (1991) "Iophenoxic and iopanoic acid as bait markers for feral goats". *Wildlife Research* 18(1): 85-90.
19. Fisher, P. M., Marks, C. A. (1997) "Evaluation of iophenoxic acid as a biomarker for swamp wallabies (*Wallabia bicolor*)". *Wildlife Research* 24(1): 97-103.
20. Fitzgerald, S. D., Kaneene, J. B. (2013) "Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: hosts, pathology, surveillance, and control". *Veterinary pathology* 50(3): 488-99.
21. Fry, T.L., Dunbar, M.R. (2007) "A review of biomarkers used for wildlife damage and disease management". USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications. Paper 759.
22. Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., et al. (2011) "Protection against Tuberculosis in Eurasian Wild Boar Vaccinated with Heat-Inactivated *Mycobacterium bovis*". *PLoS ONE* 6(9): e24905. doi:10.1371/journal.pone.0024905
23. Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J. M., Rey, J. M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, M. (2006) "Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004)". *Preventive Veterinary Medicine* 74(2-3): 239-247.
24. Hope, J. C., Vordermeier, H. M., (2005) "Vaccines for bovine tuberculosis: Current views and future prospects". *Expert Review of Vaccines* 4(6): 891-902.
25. Hughes, M.S., Neill, S.D., Rogers, M.S. (1996) "Vaccination of the badger (*Meles meles*) against *Mycobacterium bovis*". *Veterinary microbiology* 51(3-4): 363-379.
26. Inoue, T., Nonaka, N., Kanai, Y., Iwaki, T., Kamiya, M., Oku, Y. (2007) "The use of tetracycline in anthelmintic baits to assess baiting rate and drug efficacy against *Echinococcus multilocularis* in foxes". *Veterinary Parasitology* 150(1-2):88-96.

27. Johnston, J. J., Primus, T. M., Buettgenbach, T., Furcolow, C. A., Goodall, M. J., Slate, D., Chipman, R. B., Snow, J. L., DeLiberto, T. J.(2005) "Evaluation and significance of tetracycline stability in rabies vaccine baits". *Journal of Wildlife Diseases* 41(3): 549-558.
28. Johnston, D.M., Voigt, D.R, MacInness, C.D., Bachmann, D., Lawson, K.F., Ruppreott, C.E. (1988) "An aerial baiting system for the distribution of attenuated or recombinant rabies vaccine for foxes, raccoons and skunks". *Reviews of infectious diseases* 10 suppl 4: s660-4.
29. -Jones, H. J., Swadling, K. M., Butler, E. C. V., Barry, L. A., Macleod, C. K.(2014) "Application of stable isotope mixing models for defining trophic biomagnification pathways of mercury and selenium". *Limnology and Oceanography* 59(4): 1181-1192.
30. Karulin, B. E., Nikitina, N. A., Khlyap, L. A., Litvin, V. Yu, Albov, S. A., Okhotskii, Yu V., Sushkin, N. D.(1974) "Some results and prospects of further application of radioactive isotopes for the study of small mammals as carriers of infections". *Teriologiya* 2: 218-226.
31. King, D. R., Robinson, M. H., Eason, C. T., Batcheler, D.(1998)" Iophenoxic acid as a biomarker for rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)". *Wildlife Research* 25(1): 65-68.
32. Knowlton, F.F., Savarie, P.J., Wahlgren, C.E.; Hayes, D.J., (1988) "Retention of physiological marks by ingesting baits containing Iophenoxic acid, Mirex, and Rhodamine B". *Vertebrate pest control and management materials* 5: 141-147.
33. -. Larson, G. E., Svarie, P. J., Okuno, I. (1981) "Iophenoxic acid and mirex for marking wild, bait-consuming animals". *Journal of Wildlife Management* 45(4): 1073-1077.
34. Massei,G., Jones, A., Platt, T., Cowan, D.P. (2009)"Iophenoxic acid as a long-term marker for wild boar". *Journal of wildlife management* 73(3): 458-461.
35. Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., de la Fuente, J.(2008)." Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex". *Veterinary microbiology* 127(1-2):1-9.
36. -Naranjo, V., Gortazar, C., Villar, M., de la Fuente, J.(2007) "Comparative genomics and proteomics to study tissue-specific response and function in natural *Mycobacterium bovis* infections". *Anim Health Res Rev* 8 (1): 81-8.
37. Ogilvie, S. C., Eason, C. T. (1998) "Evaluation of Iophenoxic acid and rhodamine B for marking feral ferrets (*Mustela furo*)". *New Zealand Journal of Zoology* 25(2): 105-108.
38. -Palmer, M. V., Thacker, T. C., Waters, W. R., Gortázar, C., Corner, L. A. L.(2012) "Mycobacterium bovis: A model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans". *Veterinary Medicine International*
39. Purdey, D. C.,Petcu, M.,King, C. M.(2003) "A simplified protocol for detecting two systemic bait markers (Rhodamine B and Iophenoxic acid) in small mammals". *New Zealand Journal of Zoology* 30(3): 175-184.

40. Robardet, E., Demerson, J. M., Andrieu, S., Cliquet, F. (2012) "First European interlaboratory comparison of tetracycline and age determination with red fox teeth following oral rabies vaccination programs" *Journal of Wildlife Diseases* 48(4): 858-868.
41. Sage, M., Fourel, I., Lahoreau, J., Siat, V., Berny, P., Rossi, S. (2013) "Iophenoxic acid derivatives as markers of oral baits to wildlife: New tools for their detection in tissues of a game species and safety considerations for human exposure". *Environmental Science and Pollution Research* 20(5): 2893-2904.
42. Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G., Svenson, S.B., Almeida, V. (2009). "Epidemiology of mycobacterium bovis infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal". *Journal of wildlife diseases* 45(4): 1048-1061.
43. Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B. N., Orloski, K. A., Buddle, B. M., Thacker, T. C., Lyashchenko, K. P., Waters, W. R. (2010) "Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication". *Transboundary and Emerging Diseases* 54 (4): 205-220.
44. Slate D, Algeo TP, Nelson KM, Chipman RB, Donovan D, et al. (2009) Oral Rabies Vaccination in North America: Opportunities, Complexities, and Challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 3(12): e549. doi:10.1371/journal.pntd.0000549.
45. Sweetapple, P. J., Nugent, G. (1998) "Iophenoxic acid as a serum marker for red deer (*Cervus elaphus scoticus*)". *Wildlife Research* 25(6): 649-654.
46. Southey, A.K., Sleeman, D.P., Gormley, E. (2002) "Sulfadimethoxine and Rhodamine B as oral biomarkers for European badgers (*Meles meles*)". *Journal of wildlife diseases* 38(2): 378-84.
47. Tobin, M.E., Koehler, A.E., SugiHara, R.T., (1996) "Comparison of bait markers for black rats". *Journal of wildlife management* 60(1): 202-207.
48. Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J. M., Fernandez-de-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C.(2006) "Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain". *Veterinary Research* 37(1): 107-119.
49. Vieira Pinto, M., Alberto, J., Aranha, J., Serejo, J., Canto, A., Cunha, M.V., Botelho, A. (2011) "Combined evaluation of bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) from central-east Portugal". *Journal of wildlife research* 57: 1189-1201.
50. Waters, W. R., Palmer, M. V., Buddle, B. M., Vordermeier, H. M. (2012) "Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances". *Vaccine* 30(16): 2611-2622.