

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN MEDICINA, SANIDAD Y MEJORA ANIMAL

Situación epidemiológica de Pestivirus en el Parque Nacional de Doñana: evaluación de la interacción entre rumiantes domésticos y silvestres

Saúl Jiménez Ruiz

Córdoba, septiembre de 2016



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



Departamento de Sanidad Animal

Ignacio García Bocanegra

VºBº Director

María de los Ángeles Risalde Moya

VºBº Director

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Resumen..... | 1 |
| Summary..... | 2 |
| Glosario..... | 3 |
| Introducción..... | 4 |
| <i>Diarrea vírica bovina (DVB).....</i> | <i>5</i> |
| <i>Enfermedad de la frontera (EF).....</i> | <i>9</i> |
| <i>Interfaz doméstico-silvestre.....</i> | <i>11</i> |
| <i>Parque Nacional de Doñana (PND).....</i> | <i>13</i> |
| Material y métodos | 15 |
| <i>Diseño del estudio</i> | <i>15</i> |
| <i>Análisis laboratorial.....</i> | <i>16</i> |
| <i>Encuesta epidemiológica.....</i> | <i>18</i> |
| <i>Análisis estadístico.....</i> | <i>18</i> |
| Resultados | 19 |
| Discusión..... | 20 |
| Conclusiones..... | 25 |
| Agradecimientos..... | 26 |
| Referencias bibliográficas..... | 27 |
| Anexos..... | 36 |
| <i>Anexo I: Encuesta Epidemiológica.....</i> | <i>36</i> |
| <i>Anexo II: Actividad científica durante el transcurso del Máster.....</i> | <i>39</i> |
| Anotaciones..... | 42 |

1. RESUMEN

En la Península Ibérica se ha descrito una amplia variedad de escenarios epidemiológicos en relación a los Pestivirus (familia *Flaviviridae*) de rumiantes, Virus de la Diarrea Vírica Bovina -VDVB- y Virus de la Enfermedad de la Frontera -VEF- en poblaciones de rumiantes domésticos y silvestres. Sin embargo, la información relativa al papel de los rumiantes silvestres como reservorios naturales de los Pestivirus en los ecosistemas mediterráneos sigue siendo muy limitada. Durante los meses de octubre y noviembre de 2015 se obtuvieron muestras de suero de 138 bovinos mantenidos en extensivo en el Parque Nacional de Doñana (PND), así como muestras de 101 ciervos (*Cervus elaphus*) y 102 gamos (*Dama dama*) que comparten hábitat con el ganado bovino analizado. La presencia de anticuerpos específicos frente a la proteína p80 de Pestivirus se evaluó mediante ELISA de bloqueo (bELISA) y tests de seroneutralización vírica (TSV) (cepas VDVB-1, VDVB-2 y VEF-4). Todas las muestras de suero se analizaron para detectar la presencia de ARN de Pestivirus mediante RT-PCR. El 2,2% (3 de 138) de los bovinos analizados fueron positivos a ELISA y TSV (mayores títulos frente a VDVB-1) mientras que todos los rumiantes silvestres resultaron seronegativos. No se detectó ARN vírico en ninguna de las muestras de suero analizadas. La prevalencia obtenida indica una limitada circulación de Pestivirus en el ganado bovino en la zona de estudio así como la ausencia de circulación en los rumiantes silvestres analizados. Los resultados sugieren que los rumiantes silvestres no representan actualmente un riesgo en la transmisión de Pestivirus para el ganado en el PND. Sin embargo, la presencia de poblaciones no protegidas podría favorecer la aparición de brotes y animales persistentemente infectados tras la introducción de un Pestivirus en el PND.

Palabras clave: *Pestivirus, Seroprevalencia, Interfaz, Rumiantes silvestres, España.*

2. SUMMARY

In the Iberian Peninsula a wide range of epidemiological contexts has been described in relation to the ruminant Pestivirus (*Flaviviridae* family), such as the Bovine Viral Diarrhoea Virus -BVDV- and the Border Disease Virus -BDV- in domestic and wild ruminant populations. However, the information of the wild ruminants' role as natural reservoirs of Pestivirus in Mediterranean ecosystems is still limited. During the months of October and November 2015, serum samples were obtained from 138 extensive cattle from Donana National Park (DNP), as well as samples from 101 deer (*Cervus elaphus*) and 102 fallow deer (*Dama dama*) sharing habitat with the analyzed cattle. The presence of specific antibodies against p80 protein of Pestivirus was evaluated by using both blocking ELISA (bELISA) and serum neutralization tests (SNT) (BVDV-1, BVDV-2 and BDV-4 strains). All serum samples were analyzed in order to detect the presence of Pestivirus RNA by RT-PCR. A 2.2% (3 out of 138) of the tested cattle was positive to both bELISA and SNT (higher titers against BVDV-1) while all wild ruminants were seronegative. No viral RNA was detected in any of the analyzed serum samples. The obtained prevalence indicates a limited widespread of Pestivirus in cattle inside the studied area, as well as the absence of viral circulation in the wild ruminants performed. The results suggest that currently, wild ruminants do not represent a risk of Pestivirus transmission for livestock in DNP. However, the presence of naïve populations may favor the appearance of outbreaks and persistently infected animals after the introduction of a Pestivirus in the DNP.

Keywords: *Pestivirus, Seroprevalence, Interface, Wild ruminants, Spain.*

3. GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

bELISA: test inmunoenzimático de bloqueo

DVB: diarrea vírica bovina

cp: biotipo citopático

CSE: centro y sur de España

EF: enfermedad de la frontera

ELISA: test inmunoenzimático

EM: enfermedad de las mucosas

IPI: individuo persistentemente infectado

lcp: biotipo linfocitopático

nep: biotipo no citopático

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI: persistentemente infectado

PND: Parque Nacional de Doñana

PPC: peste porcina clásica

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TBb: tuberculosis bovina

TSV: tests de seroneutralización vírica

VDVB: virus de la diarrea vírica bovina

VEF: virus de la enfermedad de la frontera

VPPC: virus de la peste porcina clásica

4. INTRODUCCIÓN

Los Pestivirus son un género de virus de distribución mundial pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Son virus ARN de cadena simple de 12,3 Kb, polaridad positiva flanqueada por regiones 5' y 3' no transcribibles. Presentan morfología esférica, encapsulados con un tamaño de unos 50-60 nm de diámetro (Meyers y Thiel, 1996). Actualmente, se han descrito 4 especies de Pestivirus aceptadas por el Comité Internacional de Taxonomía Vírica: virus de la diarrea vírica bovina tipo 1 (VDVB-1) y tipo 2 (VDVB-2), virus de la enfermedad de la frontera (VEF) y virus de la peste porcina clásica (VPPC) que afectan principalmente a bovinos, pequeños rumiantes y suidos, respectivamente (Thiel y cols., 2005). Además, debido a una escasa especificidad de especie, principalmente del VDVB y del VEF, así como a la condición de ARN monocatenario que les proporciona una gran variabilidad genética, se han descrito nuevos subgrupos víricos aún por clasificar denominados “*HoBi-like, VDVB-3 o Pestivirus atípicos*” (Figura 1) (Liu y cols., 2009; Mao y cols., 2012; Bauermann y cols., 2013; Bauermann y Ridpath, 2015). Estos Pestivirus atípicos se han detectado en jirafa (*Giraffa camelopardis*), suero fetal bovino, antílope americano (*Antilocapra americana*) y lechones mortinatos en Bungowannah (Schweizer y Peterhans, 2014; Ridpath, 2015).

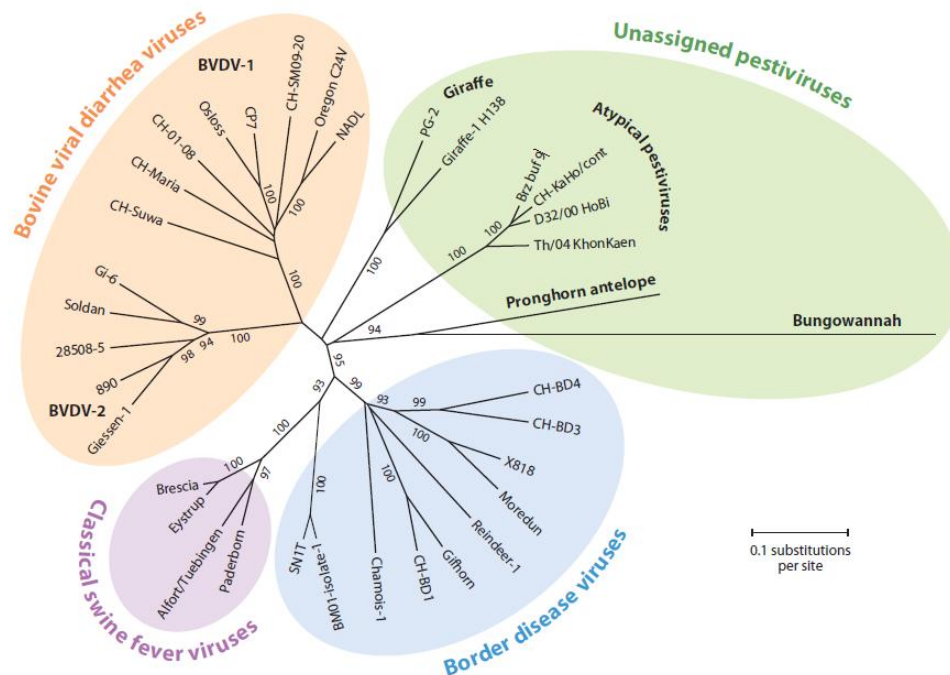


Figura 1. Análisis filogenético y clasificación de Pestivirus (Schweizer y Peterhans, 2014)

Los Pestivirus presentan una importante repercusión económica y en sanidad animal. El principal impacto de las infecciones asociadas a Pestivirus en animales domésticos radica en la capacidad del virus para atravesar la barrera transplacentaria y provocar trastornos reproductivos (Nettleton, 2000; Thornton, 2010). Los principales signos clínicos incluyen mortalidad fetal, reabsorción embrionaria, momificaciones, abortos o infección persistente del feto, si la infección se produce en el primer tercio de la gestación. En este último caso, los animales infectados quedarán como inmunotolerantes o persistentemente infectados (PIs). Durante este periodo de gestación, el sistema inmunitario de los IPIs no reconoce los antígenos de los virus homólogos a aquel que produjo la infección y por tanto, no genera una respuesta inmune efectiva frente a ellos. Los individuos IPIs no producen anticuerpos frente al virus, adquiriendo inmunotolerancia y permitiendo su replicación y diseminación constante. Los IPIs excretan y secretan grandes cantidades de virus durante toda su vida, jugando un papel muy importante en la difusión y el mantenimiento de la enfermedad en los rebaños infectados (Houe, 1995; Bachofen y cols., 2010; Schweizer y Peterhans, 2014) y otras especies simpátricas (Frölich y cols., 2002; Vilček y Nettleton, 2006).

La presencia de anticuerpos frente a Pestivirus se ha descrito en más de 40 especies de ungulados silvestres, con prevalencias variables en función de la región geográfica o la proximidad con especies domésticas, entre otros factores (Vilček y Nettleton, 2006). Actualmente, algunos investigadores sugieren que la transmisión de Pestivirus entre las especies silvestres y el ganado puede ser bidireccional, especialmente en casos de coexistencia espacio-temporal (Marco y cols., 2007; Passler y cols., 2009). Sin embargo, otros autores teorizan que en fauna silvestre los Pestivirus mantienen un ciclo epidemiológico independiente del ganado doméstico (Van Campen y cols., 2001b; Kirchgessner y cols., 2013).

Diarrea vírica bovina (DVB)

El VDVB-1 se describió por primera vez en los años 40 (Olafson y cols., 1946). En la actualidad, el VDVB-1 presenta una distribución mundial, siendo responsable del 90% de los aislamientos en Europa (Lindberg y cols., 2006). El VDVB-2 se identificó por primera vez en Canadá en la década de los 90 (Pellerin y cols., 1994), siendo responsable de más del 50% de aislamientos en este país (Lindberg y cols., 2006).

Además, el VDVB-2 ha sido esporádicamente descrito en Japón, Brasil y distintos países europeos incluyendo Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia, Italia y España (Becher y cols., 1995; Paton y cols., 1995; Sakoda y cols., 1999; Vilček y cols., 2001; Couvreur y cols., 2002; Flores y cols., 2002; Schirrmeyer y cols., 2004; Aduriz y cols., 2015).

Dentro del VDVB-1 se han propuesto al menos 17 subespecies víricas (VDVB-1, a-q), mientras que el VDVB-2 incluye 3 subespecies de virus (VDVB-2, a-c) (Pellerin y cols., 1994, 1995; Becher y cols., 1997, 1999; Vilček y cols., 2001; Luzzago y cols., 2014). Cada uno de ellos puede presentar biotipos citopáticos (cp) y no citopáticos (ncp) según su capacidad de causar efecto citopático durante su replicación en las células epiteliales. Los biotipos ncp son los más frecuentes en la naturaleza, representando más de un 70% del total (Fulton y cols., 2000, 2005). Los biotipos cp provienen de biotipos ncp que sufren mutaciones en individuos infectados (Rondón-Barragán, 2006). Un tercer tipo, biotipo linfocitopático (lcp), ha sido propuesto por inducir efecto citopático al replicarse en células linfoides pero no en células epiteliales (Ridpath y cols., 2006).

El genotipo, biotipo y virulencia de la cepa, así como el momento de la infección y el estado inmunológico del hospedador son los principales factores que determinan la presentación clínica de la enfermedad (Fulton y cols., 2000; Brock, 2004; Fulton y cols., 2005). Cuando un animal se infecta después del nacimiento puede desarrollar indistintamente síndrome febril, cuadros respiratorios, digestivos, inmunológicos, musculoesqueléticos y nerviosos (Brock, 2004; Molina y cols., 2014), describiéndose en algunos casos un síndrome hemorrágico severo (Carman y cols., 1998). Aunque la mayor parte de las infecciones en el ganado son clínicamente asintomáticas, la aparición de signos clínicos y la gravedad de los mismos pueden ser muy variables dependiendo de la virulencia de la cepa o la presencia de infecciones secundarias (Deregt y Loewen, 1995).

Sin embargo, cuando la infección ocurre vía vertical durante la gestación, puede desencadenarse la muerte fetal y reabsorción embrionaria, momificación y aborto, nacimiento de animales con malformaciones o individuos aparentemente sanos pero persistentemente infectados (IPIs) cuando la infección resulta de un biotipo ncp y tiene

lugar entre los días 45 y 125 de gestación (Moennig y Liess, 1995; Grooms, 2004) (Figura 2).

Dado que el VDVB resulta poco estable en el medio ambiente (Nettleton y Entrican, 1995) y que los animales con infección aguda infectados tras el nacimiento excretan virus durante un corto periodo de tiempo (Houe, 1999), los IPIs, que corresponden al 1-2% de la cabaña ganadera, tienen gran importancia epidemiológica en la transmisión directa del virus (Bolin y Grooms, 2004; Confer y cols., 2005). Se estima que el 50% de los rebaños europeos infectados por VDVB tienen algún IPI y el 90% de los bovinos de estas explotaciones se infectan por VDVB alguna vez a lo largo de su vida (Lindberg y cols., 2001). El contacto posterior con un biotipo cp homólogo a aquel que dio lugar a la infección persistente origina en los IPIs la enfermedad de las mucosas (EM) (Confer y cols., 2005; Smirnova y cols., 2008). Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, erosión de las mucosas gastrointestinales, destrucción de los tejidos linfoides del tracto digestivo, diarrea profusa y muerte (Liebler-Tenorio y cols., 2000).

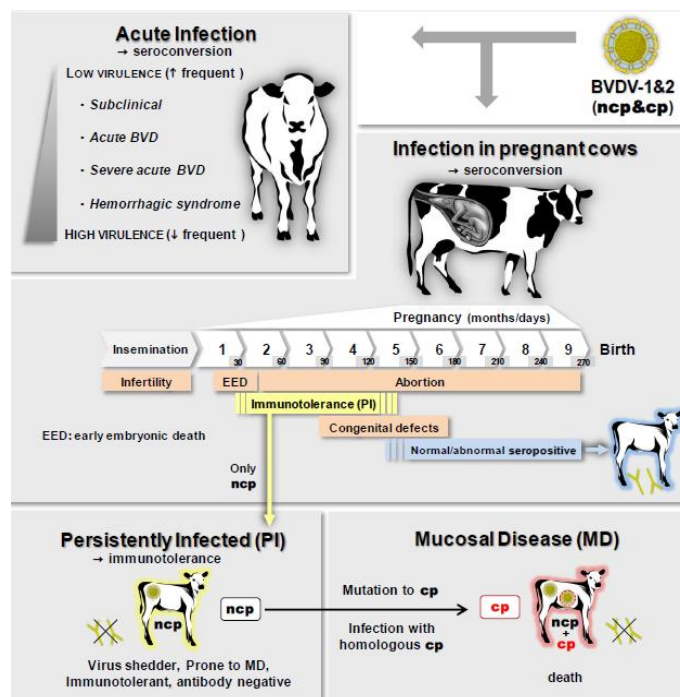


Figura 2. Representación esquemática de las manifestaciones clínicas post-infección con el VDVB (Romero-Palomo y cols., 2016)

La DVB está incluida dentro de la lista de enfermedades de la OIE (OIE, 2016). Las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad en ganadería han dado lugar a la

puesta en marcha de campañas de erradicación en diferentes países europeos (Houe y cols., 2006). España carece actualmente de un programa de erradicación de DVB, si bien, diversos estudios serológicos ponen de manifiesto una amplia difusión en distintas zonas ganaderas de nuestro país, prevaleciendo el aislamiento del genotipo VDVB-1b (Arias y cols., 2003; Hurtado y cols., 2003). En las distintas comunidades autónomas estudiadas se observaron prevalencias de moderadas a altas en Galicia (17,1%) (Eiras y cols., 2012), Andalucía (42,3%) (Gómez-Pacheco y cols., 2009), Asturias (48,8%) (Prieto y cols., 1998), Castilla y León (51,3%) (Álvarez y cols., 1994), Extremadura (53,3%) (Marín, 1997) y Madrid (65,6%) (Vega y cols., 2004). En otros países europeos se han detectado prevalencias igualmente elevadas, tales como 27-36% en Portugal (Niza-Ribeiro y cols., 2005), 43,4% en Hungría (Kóvágó y cols., 2015), 53,3% en Italia (Luzzago y cols., 1999), 57,6% en Suiza (Rüfenacht y cols., 2001), 60% en Francia (Beaudeau y cols., 2001), 70,7% en Polonia (Kuta y cols., 2013) y 70-90% en el Reino Unido (Humphry y cols., 2012).

En la actualidad, la información relativa al papel epidemiológico de los rumiantes silvestres en la transmisión de VDVB es muy limitada. La infección por VDVB cursa habitualmente de forma asintomática o con signos clínicos inespecíficos, manifestando en escasas ocasiones lesiones similares a las encontradas en domésticos (Tessaro y cols., 1999; Van Campen y cols., 2001a; Passler y cols., 2007; Ridpath y cols., 2007). Los principales signos clínicos y lesiones observadas en rumiantes silvestres incluyen caquexia, anorexia, apatía e inmunosupresión, inflamación hemorrágica de las mucosas, lesiones erosivas o ulcerativas en las mucosas digestivas y enteritis catarral o hemorrágica (Van Campen y cols., 2001a; Duncan y cols., 2008; Raizman y cols., 2009). Así mismo, han sido descritas infecciones transplacentarias en condiciones experimentales en diferentes especies de rumiantes silvestres (Van Campen y cols., 2001a; Passler y cols., 2010). En España, las referencias de la situación epidemiológica del VDVB en ungulados silvestres están limitadas a estudios regionales, observándose amplias diferencias en la prevalencia en función de la especie y la zona geográfica (Marco y cols., 2011; Fernández-Aguilar y cols., 2016; Paniagua y cols., 2016; Rodríguez-Prieto y cols., 2016).

Enfermedad de la frontera (EF)

Hasta la fecha, se han descrito 7 subespecies de VEF en Europa (Giammarioli y cols., 2011). VEF-1 ha sido aislado en ovejas Reino Unido (Vilček y cols., 1997), VEF-2 en Alemania (Becher y cols., 2003), VEF-3 en Suiza y Austria (Stalder y cols., 2005; Krametter-Froetscher y cols., 2007), VEF-4 en España (Arnal y cols., 2004; Valdazo-González y cols., 2008) y VEF-5, VEF-6, VEF-7 (VEF-Tunisian) en Francia (Dubois y cols., 2008). No obstante, la EF puede ser causada tanto por VEF como por VDVB-1 y VDVB-2 (Paton y cols., 1995; Giangaspero y Harasawa, 2004), provocando principalmente fallos reproductivos en pequeños rumiantes (Nettleton, 2000), aunque ocasionalmente puede infectar a bóvidos y suidos (Vilček y Belák, 1996; Cranwell y cols., 2007; Cabezón y cols., 2010).

La transmisión del VEF puede tener lugar de forma horizontal por contacto directo o verticalmente vía transplacentaria (*Figura 3*). La transmisión horizontal es principalmente por vía oro-nasal, por la excreción del virus a través de la saliva, heces y orina. La infección cursa con frecuencia de forma subclínica o con una sintomatología leve caracterizada por un proceso febril y leucopenia. Tras un corto periodo de viremia transitoria, aparecen anticuerpos neutralizantes en suero (Nettleton y Willoughby, 2007). Sin embargo, se han descrito epizootias de VEF con elevada mortalidad en pequeños rumiantes asociadas a síndrome hemorrágico severo (Chappuis y cols., 1986; Vega y cols., 2015). La transmisión vertical origina abortos o nacimiento de IPIs si la infección se produce entre los días 50-60 de gestación (Schweizer y Peterhans, 2014). Estos IPIs suelen ser animales aparentemente sanos aunque pueden nacer débiles, con alteraciones de la lana, síntomas neurológicos y alteraciones musculo-esqueléticas (Nettleton y cols., 1998). Generalmente presentan un crecimiento lento y una corta esperanza de vida pero participan igualmente en la diseminación del virus en la explotación.

La distribución del VEF en Europa es amplia y relativamente variable entre países y regiones. Estudios realizados en diferentes países muestran seroprevalencias de pequeños rumiantes que oscilan entre el 30% en Irlanda (Graham y cols., 2001), 30-90% en Austria (Krametter-Froetscher y cols., 2007) y 80-100% en Suiza (Stalder y cols., 2005) en rebaños ovinos; y entre el 0-1% en Dinamarca (Tegtmeier y cols., 1999), 23% en Suiza (Danuser y cols., 2009), 27% en Holanda (Orsel y cols., 2009) y 4-50%

en Austria (Preyler-Theiner y cols., 2009), para rebaños caprinos. En España, estudios epidemiológicos llevados a cabo en diferentes regiones arrojaron valores de seroprevalencia que oscilaron entre el 10% y el 80% en el ganado ovino y del 0% al 7% en rebaños caprinos (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1999; Berriatua y cols., 2004; Valdazo-González y cols., 2006; Alba y cols., 2008; Marco y cols., 2008; Falconi y cols., 2010; Fernández-Aguilar y cols., 2016). Así mismo, recientemente se ha detectado circulación de VEF en explotaciones de ganado bovino en Andalucía (Paniagua y cols., 2016).

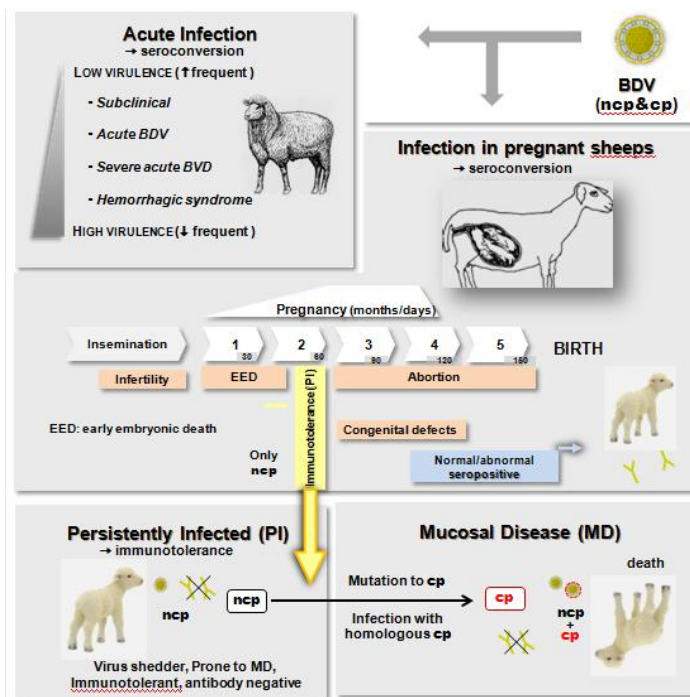


Figura 3. Representación esquemática de las manifestaciones clínicas post-infección con el VEF

La información relativa a la sintomatología clínica por infección de Pestivirus en ungulados silvestres es muy limitada (Martin y cols., 2013). El único caso de mortalidad causada por el VEF se describió en rebeco pirenaico (*Rupicapra pyrenaica*). Las elevadas tasas de mortalidad de los brotes iniciales, en el año 2001, provocaron un descenso de un 42% en las poblaciones de rebecos de la zona afectada (Marco y cols., 2007). Estudios moleculares identificaron al agente causal como VEF-4 (Hurtado y cols., 2004). En 2005, un nuevo brote originó mortalidades de hasta el 85% en algunas zonas del Pirineo Catalán (Marco y cols., 2008). Entre 2009 y 2010 otro brote afectó a la población de rebecos de Andorra originando un descenso de la población del 41%

(Fernández-Sirera y cols., 2012a). Los rebecos infectados presentaron depresión, debilidad, dificultad de movimiento, alopecia, hiperpigmentación de la piel, neumonía y procesos infecciosos secundarios, así como alteraciones hematológicas y bioquímicas (Fernández-Sirera y cols., 2011). Estudios realizados en el suroeste de los Alpes italianos revelaron una alta seroprevalencia en el rebeco alpino (*Rupicapra rupicapra*), sugiriendo que la infección por VEF es frecuente en ambas especies del género *Rupicapra* (Fernández-Sirera y cols., 2012b).

Además de en rebeco pirenaico y alpino, la presencia de anticuerpos frente al VEF se ha detectado en corzo (*Capreolus capreolus*) (Frölich y Hofmann, 1995), muflón (*Ovis aries musimon*) (Martin y cols., 2011), reno (*Rangifer tarandus*) y bisonte europeo (*Bison bonasus*) (Becher y cols., 1999; Borchers y cols., 2002).

Interfaz doméstico-silvestre

El término “interfaz” o “interfase” hace referencia a la red de vínculos generada entre los distintos elementos integrantes de un sistema (Dhama y cols., 2013). La interfaz sanitaria entre fauna silvestre y ganado es actualmente una fuente de conflictos que enfrenta opiniones ambientalistas y antropocéntricas, las cuales han sido ampliamente revisadas (Frölich y cols., 2002; Simpson, 2002; Gortázar y cols., 2007, 2010; Miller y cols., 2013). Para llevar a cabo programas de lucha de muchas enfermedades infecto-contagiosas resulta necesaria la evaluación de las infecciones compartidas en dicha interfaz, ya que la sanidad animal es un elemento fundamental para el sector ganadero y cinegético así como para la conservación de la biodiversidad (Gortázar y cols., 2007).

Desde un punto de vista ecológico, la gran biodiversidad existente en la Península Ibérica está relacionada directamente con factores antropogénicos. La despoblación del mundo rural acontecida en las últimas décadas (INE, 2014) ha dado lugar a un abandono parcial de los terrenos agrarios o ganaderos, orientándose éstos a otro tipo de aprovechamiento. Grandes áreas privadas del centro y sur de España (CSE) históricamente agroganaderas presentan en la actualidad un uso compartido con la actividad cinegética (Delibes-Mateos y cols., 2009; Kukielka y cols., 2013). Este factor, ha ocasionado que las diferentes especies de ungulados silvestres presentes en el CSE

compartan la misma base territorial que la ganadería extensiva (Olea y San Miguel, 2006), facilitando de este modo la transmisión bidireccional de agentes patógenos (Gortázar y cols., 2010).

A nivel económico, la caza en España genera anualmente unos 3.600 millones de euros y 54.000 puestos de trabajo (Garrido, 2012). En este sentido, el número de licencias expedidas, la bolsa de caza y la producción de carne son buenos indicadores del incremento de esta actividad que, en las últimas décadas, se ha ido perfilando como una alternativa económica en zonas de economía desfavorecida, de accidentada orografía y abundantes terrenos improductivos (Farfán y cols., 2004). La gestión actual de este tipo de fincas, principalmente en el CSE, puede conducir a sistemas de explotación semi-extensivos donde para incrementar los ingresos por número de capturas durante el periodo de actividad cinegética, se mantienen densidades de ungulados silvestres mucho más elevadas de las que soportaría el medio en condiciones naturales. Para alcanzar estas densidades, es habitual la implementación de medidas de gestión tales como manejo de hábitat, repoblaciones, control reproductivo o suplementación de alimento y agua, entre otras (Sáenz de Buruaga y cols., 2009). Así pues, la readaptación del uso del suelo, la ausencia de depredadores, el proteccionismo y los propios intereses cinegéticos han originado un remarcable incremento de las poblaciones de ungulados silvestres (Acevedo y cols., 2011), situación que ocasiona importantes conflictos entre ganaderos, cazadores y conservacionistas en el CSE (Gortázar y cols., 2006).

Desde un punto de vista sanitario, la gestión cinegética puede influir en la sanidad de la fauna y el ganado doméstico tanto de forma positiva (control de poblaciones, eliminación de animales enfermos) (Torres-Porras y cols., 2009) como de forma negativa (introducción patógenos por translocaciones, repoblaciones, sobreabundancia, etc.) (Höfle y cols., 2004). Diversos autores señalan que el limitado control realizado en las fincas del CSE favorece la emergencia o re-emergencia de enfermedades, especialmente en aquellas áreas donde la intensificación del manejo es más frecuente (Vicente y cols., 2007; Castillo y cols., 2011). Dado que las especies silvestres se consideran reservorios de más del 70% de las enfermedades emergentes a nivel mundial (Jones y cols., 2008), la erradicación total de una enfermedad compartida con el ganado, resulta inviable si no se tienen en cuenta los reservorios silvestres (O'Reilly y Daborn, 1995, Gortázar y cols., 2007; Miller y cols., 2013). Por lo tanto,

son necesarias las colaboraciones interdisciplinarias (Buttke y cols., 2015) para un abordaje global de las infecciones compartidas incluyendo el estudio sobre todos los componentes implicados en esta interfase (Coker y cols., 2011).

Parque Nacional de Doñana (PND)

El Parque Nacional de Doñana es un espacio natural protegido situado al este de Andalucía. Con una superficie de 53.709 ha, la biodiversidad del Parque resulta única en Europa debido a sus múltiples ecosistemas. Cada uno de ellos posee fauna propia y diferenciada, encontrándose en el Parque un total de 20 especies de peces de agua dulce, 11 de anfibios, 21 de reptiles, 37 de mamíferos no marinos y 360 aves. La marisma, con más de 27.000 ha, destaca como lugar de paso, cría e invernada para miles de aves europeas y africanas. Playas, dunas y dunas móviles marcan la zona limítrofe con el océano, y los cotos son ecosistemas cargados de matorral y vegetación donde coexisten alrededor de 80 especies de vertebrados, incluyendo especies en peligro de extinción como el águila imperial (*Aquila adalberti*) o el lince ibérico (*Lynx pardinus*), así como distintos ungulados silvestres: ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y jabalí (*Sus scrofa*) (MAGRAMA, Parque Nacional de Doñana). El área de contacto del matorral de los cotos con la marisma tiene lugar a través de una franja de 200 a 1.500 m de anchura denominada "vera", que corresponde a un ecotono de gran riqueza ecológica. En esta estrecha franja interaccionan con frecuencia la mayor parte de especies animales presentes en el Parque (Barasona y cols., 2014).

El Plan Rector de Uso y Gestión del Parque considera entre otros aprovechamientos tradicionales la ganadería extensiva, si bien el Plan Sectorial de Aprovechamiento Ganadero recomienda su disminución y el fomento de la utilización de razas autóctonas (vaca marismeña y caballo de retuerta) (Junta de Andalucía, 2008). La gestión del ganado doméstico en el PND queda regulada en el “Plan de Aprovechamiento Ganadero del PND”. Como actividades de este Plan se realiza registro y control de entrada de ganaderos, se mantienen vallados perimetrales de exclusión y de infraestructuras ganaderas y se aplica la normativa sanitaria existente, realizándose los saneamientos ganaderos en vacuno en función de su calificación sanitaria frente a las diferentes enfermedades sometidas a programas de control en España (Espacio Natural Doñana, 2000).

La comarca de Doñana cuenta en la actualidad con más de 1.600 ejemplares bovinos y 1.500 equinos. Con el ganado bovino coexisten tres especies de ungulados silvestres: ciervo, gamo y jabalí. El censo de ungulados silvestres en el PND se estima en torno a 1300 ciervos, 800 gamos y 1.700 jabalíes (EBD, 2014). Los rebaños de ganado bovino permanecen separados en las diferentes fincas (*Figura 4*) separadas por vallados ganaderos. Dado que este tipo de vallados permite el paso de la fauna silvestre, son frecuentes las interacciones inter e intraespecíficas entre diferentes especies (Espacio Natural Doñana, 2000). El riesgo de contacto entre el ganado bovino y las especies de ungulados silvestres simpátricas determina la transmisión y persistencia de enfermedades infecciosas compartidas en un entorno único como es el PND (Gortázar y cols., 2008; Barasona y cols., 2014).

Los objetivos del presente estudio son: **1) Determinar la prevalencia de infección por Pestivirus en rumiantes domésticos y silvestres en el Parque Nacional de Doñana y 2) Evaluar el papel epidemiológico de estas especies como reservorios naturales de Pestivirus.**

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El presente trabajo se realizó en cinco fincas incluidas en el PND ($36^{\circ}56'51''N$ $6^{\circ}21'31''O/36.9475, -6.35861$) (*Figura 4*). El área de estudio es una zona llana y parcialmente inundable (0-47 m de altitud sobre el nivel del mar) que bordea el océano Atlántico a nivel de la desembocadura del río Guadalquivir. Presenta un clima mediterráneo subhúmedo y marcada estacionalidad, de modo que en épocas lluviosas la marisma se inunda desplazando a los ungulados a las zonas más elevadas del Parque, mientras que en verano la escasez de alimento y agua provoca agregaciones espaciales en torno a la vera, ecotono húmedo existente entre el matorral y las marismas secas.

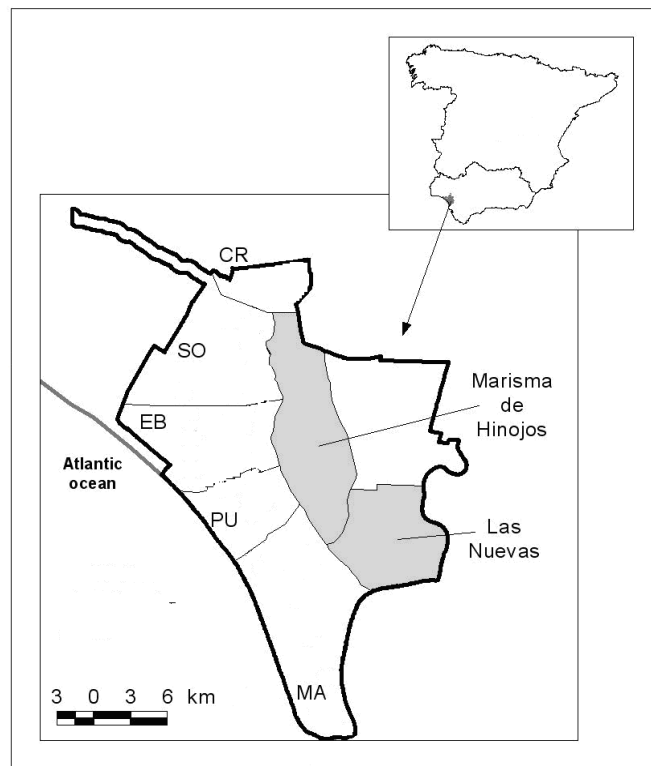


Figura 4. Zonificación del Parque Nacional de Doñana (CR, Coto del Rey; SO, Los Sotos; EB, Estación Biológica; PU, El Puntal; MA, Marismillas)

Durante los meses de octubre y noviembre de 2015 se obtuvieron muestras de suero de 138 bovinos mantenidos en extensivo en el PND. Además, se tomaron muestras de 101 ciervos y 102 gamos que comparten hábitat con el ganado bovino analizado. La distribución de animales incluidos por finca queda reflejada en la *tabla 1*.

| Finca | Bovino | Ciervo | Gamo |
|-------------------------------------|------------|------------|------------|
| Coto del Rey | 0 | 20 | 20 |
| Los Sotos | 24 | 23 | 20 |
| Estación Biológica de Doñana | 31 | 18 | 21 |
| El Puntal | 43 | 20 | 20 |
| Marismillas | 40 | 20 | 21 |
| TOTAL | 138 | 101 | 102 |

Tabla 1. *Distribución de individuos muestreados por finca*

La toma de muestras se realizó empleando la punción de la vena caudal mediana en bovino doméstico aprovechando la campaña oficial de saneamiento ganadero, y mediante la técnica de punción de los senos venosos endocraneales en los rumiantes silvestres (Jiménez-Ruiz y cols., *en revisión*) durante el periodo de control de poblaciones de ungulados silvestres que se lleva a cabo en el Parque. Las muestras de sangre obtenidas se refrigeraron y se enviaron al laboratorio de análisis de enfermedades infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba. Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 15 minutos dentro de las primeras 24 horas tras su recogida para la obtención del suero, el cual fue conservado a -20 °C hasta su análisis laboratorial.

Análisis Laboratorial

Análisis serológicos

La detección de anticuerpos específicos frente a la proteína p80 de Pestivirus (VDVB y VEF) se realizó empleando un test inmunoenzimático de bloqueo (bELISA) comercial (Ingezim Pestivirus Compac 12.BVD.K3. Ingenasa, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La unión antígeno-anticuerpo se evidenció mediante una reacción colorimétrica de intensidad inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos de la muestra, empleando un espectrofotómetro de absorción molecular (Jasco V670, Madrid, España) a una longitud de onda de 450nm.

Las muestras se consideraron positivas cuando su densidad óptica (DO) fue inferior al *cut off positivo* y negativas cuando fue superior al *cut off negativo*. Los sueros con DO entre ambos *cut off* se consideraron dudosas. Los *cut off* o puntos de corte se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante/de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Cut off positivo} = 0,5 \times \text{Abs media control negativo.}$$

$$\text{Cut off negativo} = 0,55 \times \text{Abs media control negativo.}$$

Con el objetivo de confirmar los resultados de las pruebas bELISA y determinar la especificidad de los anticuerpos frente a alguno de los Pestivirus de rumiantes (VDVB y VEF), todas las muestras positivas y dudosas se analizaron mediante test de seroneutralización vírica (TSV). El TSV consiste en determinar la capacidad de los anticuerpos de un suero para neutralizar el efecto de un virus específico sobre una línea celular sensible. Para ello se utilizaron diferentes diluciones del suero problema, comparándose los resultados con los obtenidos por un suero control.

Dado que no existe una cepa de virus ideal, en la práctica se debe seleccionar aquella que detecte la mayor proporción de reacciones serológicas en la población local de ganado. En nuestro caso, se emplearon cepas de Pestivirus aislados en España hasta la fecha (VDVB-1, VDVB-2 y VEF-4). Estas cepas han sido empleadas previamente en diversos estudios realizados en fauna silvestre y en ganado doméstico en España (Vega y cols., 2002; Marco y cols., 2009; Paniagua y cols., 2016). Los TSV se realizaron en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA, Barcelona), siguiendo el protocolo establecido por la Organización Mundial en Sanidad Animal en el “Manual de la OIE sobre animales terrestres 2013” (OIE, 2015).

Análisis moleculares

Todas las muestras de suero se analizaron mediante RT-PCR empleando pools de 200µl que incluyeron cuatro sueros (50µl por suero) para ahorrar tiempo y recursos económicos. De haber obtenido un pool positivo se habrían analizado los cuatro sueros individualmente. La extracción de ARN viral de las muestras se realizó empleando el kit comercial Nucleospin Viral RNA isolation (Macherey Nagel, Düren, Germany). La amplificación del ARN obtenido se llevó a cabo mediante el kit comercial One-Step PCR kit (Qiagen, Hilden, Alemania), utilizando los primers pan-Pestivirus 324/326 y un termociclador estándar (Applied Biosystems, modelo Gene Amp PCR System 9700) en

las condiciones descritas por Vilček y cols. (1994, 1996). Para la identificación del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agar al 2 % y se visualizó en un lector de geles (Syngene U: venus).

Encuesta epidemiológica

Durante el muestreo se registraron como variables epidemiológicas el nombre y localización de la finca así como la raza, el sexo y la edad de los animales muestreados. En los rumiantes silvestres analizados se recogió información individual relativa a la especie, edad, sexo, condición corporal y lesiones macroscópicas. La edad de los animales se determinó a partir del reemplazamiento dentario tal y como describieron Sáenz de Buruaga y cols. (1991) clasificando a los individuos en tres categorías: jóvenes (< 1 año de edad), sub-adultos (1 a 3 años) y adultos (> 3 años).

La información relacionada con el manejo del ganado y su interacción con rumiantes silvestres se recogió mediante entrevista personal con los ganaderos empleando una encuesta epidemiológica e incluyó información relacionada con (1) datos personales del ganadero, (2) datos del ganado, (3) datos de la fauna silvestre y (4) datos sanitarios, (5) medidas de bioseguridad (*Anexo I*).

Análisis Estadístico

La prevalencia de anticuerpos frente a Pestivirus se estimó a partir de la relación entre resultados positivos a ambas técnicas (bELISA y TSV) y la suma total de animales examinados, con la exacta binomial y un intervalo de confianza del 95% (Martín y cols., 1987).

6. RESULTADOS

De los 341 rumiantes muestreados, 35 bovinos, 13 ciervos y 1 gamo resultaron positivos o dudosos a bELISA. Todos los animales positivos y dudosos a bELISA fueron analizados por TSV, confirmándose exclusivamente la presencia de anticuerpos frente a Pestivirus en tres vacas. El resto de animales dudosos y seropositivos a bELISA y negativos por TSV, se consideraron negativos y falsos positivos, respectivamente. Por lo tanto, la seroprevalencia estimada fue del 2,2% (IC_{95%}: 0,0 - 4,6%) en el ganado bovino y del 0,0% (IC_{95%}: 0,0 - 0,1%) en los rumiantes silvestres analizados (Tabla 2).

| Grupo de individuos | n | Positivo + dudoso bELISA | Positivo TSV | Seroprevalencia Pestivirus (IC _{95%}) |
|---------------------|-----|--------------------------|--------------|---|
| Bovinos | 138 | 35 | 3 | 2,17% (IC _{95%} : 0,0 - 4,6%) |
| Ciervos | 101 | 13 | 0 | 0,0% (IC _{95%} : 0,0 - 0,1%) |
| Gamos | 102 | 1 | 0 | 0,0% (IC _{95%} : 0,0 - 0,1%) |
| Total | 341 | 49 | 3 | 0,9% (IC _{95%} : 0,0 - 1,9%) |

Tabla 2. Relación de individuos positivos a las técnicas de diagnóstico y seroprevalencia de Pestivirus

Los individuos positivos fueron tres hembras adultas de raza marismeña localizadas en las fincas de Marismillas (2/3) y El Puntal (1/3). Los títulos seroneutralizantes más elevados se detectaron frente a VDVB-1 para los tres individuos (Tabla 3).

| Id. Animal | Finca | Sexo | Edad (años) | VDVB-1 | VDVB-2 | VEF-4 |
|--------------|-------------|--------|-------------|--------|--------|-------|
| Bv-11 | Marismillas | Hembra | 17 | 1:80 | 1:40 | 1:20 |
| Bv-33 | Marismillas | Hembra | 6 | 1:40 | 1:20 | 1:10 |
| Bv-74 | El Puntal | Hembra | 15 | 1:160 | 1:20 | 1:10 |

Tabla 3. Caracterización y títulos seroneutralizantes de los individuos positivos a Pestivirus

No se detectó ARN vírico en ninguna de las 138 y 203 muestras de suero de rumiantes domésticos y silvestres analizadas, respectivamente.

7. DISCUSIÓN

El potencial de los ungulados silvestres como reservorios naturales de agentes patógenos que afectan a las especies domésticas ha sido frecuentemente descrito (Gortázar y cols., 2007; Van Campen y Rhyan, 2010; Martin y cols., 2011), si bien el papel de estas especies en la epidemiología de los Pestivirus es aún incierto. Algunos autores sostienen que los rumiantes silvestres actúan como hospedadores de Pestivirus para el ganado doméstico. Para Passler y cols. (2009), el VDVB se mantuvo en las poblaciones de ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en los Estados Unidos, infectando posteriormente al ganado doméstico. En Europa, Martin y cols. (2015) aislaron una cepa de VEF en rebeco alpino con 92% de homología con los aislados ovinos de la misma región, sugiriendo transmisión interespecífica entre estas especies. Más recientemente, Rodríguez-Prieto y cols. (2016) han descrito circulación activa de VDVB entre ungulados domésticos y silvestres en la zona centro de España.

Sin embargo, otros autores describen ciclos epidemiológicos independientes entre el ganado doméstico y la fauna silvestre. En Estados Unidos, Van Campen y cols. (2001b) aislaron cepas de VDVB en poblaciones de ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) distintas a las que circulaban en el ganado bovino. Estos resultados son similares a los descritos por Kirchgessner y cols. (2013) en ciervo de cola blanca. Así mismo, estudios realizados en diferentes países europeos y en ecosistemas generalmente asociados a pastos de alta montaña, también han observado ciclos epidemiológicos independientes (Marco y cols., 2009; Bregoli y cols., 2012; Casaubon y cols., 2012). Recientemente, Paniagua y cols. (2016) evaluaron la transmisión de Pestivirus en ecosistemas mediterráneos del sur de España, concluyendo que no existen ciclos epidemiológicos diferentes y que las poblaciones de rumiantes silvestres no representan un riesgo potencial para la transmisión de Pestivirus a los rumiantes domésticos. En el presente estudio hemos evaluado conjuntamente y durante un mismo periodo de tiempo la prevalencia de Pestivirus tanto en el bovino como en poblaciones de rumiantes silvestres (ciervo y gamo) que comparten el mismo hábitat en diferentes ecosistemas del PND. Nuestros resultados son consistentes con los observados por Paniagua y cols. (2016) suportando la hipótesis de que los Pestivirus presentan un ciclo epidemiológico independiente en el ganado doméstico en zonas donde comparten hábitat con poblaciones de rumiantes silvestres en el sur de España. Además, las seroprevalencias

obtenidas y la ausencia de detección de ARN vírico indican una limitada circulación de Pestivirus en las poblaciones de rumiantes domésticos y silvestres del área de estudio.

La prevalencia de anticuerpos detectada en ganado bovino (2,2%) en el PND es considerablemente inferior a la obtenida en esta especie en otras zonas de España, con valores que oscilan entre el 21% y 65 % (Mainar-Jaime y cols., 2001; Vega y cols., 2004; Gómez-Pacheco y cols., 2009; Fernández-Aguilar y cols., 2016; Paniagua y cols., 2016; Rodríguez-Prieto y cols., 2016), o en otros países europeos, cuyas seroprevalencias varían entre el 30% y el 90% (Niza-Ribeiro y cols., 2005; Humphry y cols., 2012). La baja seroprevalencia obtenida en ganado bovino en el PND podría estar asociada a la ausencia de movimientos de esta especie en el PND. La reposición externa ha sido identificada por distintos autores como un factor de riesgo implicado en la transmisión de Pestivirus en las explotaciones de rumiantes (Presi y cols., 2011; Espunyes, 2014). Los bovinos analizados en el presente trabajo pertenecen a la raza marismeña, raza autóctona del PND considerada en peligro de extinción desde 1994 y caracteriza por mantenerse en régimen asilvestrado, limitándose su manejo a los saneamientos oficiales. Hasta la fecha, su explotación tiene un carácter exclusivamente ecológico, no realizándose movimiento de animales fuera del PND desde el siglo XIX (Quiroz y cols., 2007).

Por otro lado, la hipótesis de una mayor resistencia genética asociada a la propia raza marismeña no debe ser descartada. En este sentido, trabajos previos ya han sugerido la existencia de una resistencia genética a la infección con distintos patógenos involucrados en el Complejo Respiratorio Bovino como el VDVB, proponiendo incluso incorporar estrategias de mejora genética a los programas de control de esta patología con el objetivo de reducir su incidencia (Snowder y cols., 2006; Rezaeisaber y cols., 2013; Berry, 2014). En cualquier caso, serían necesarios estudios adicionales para confirmar las hipótesis anteriormente planteadas y relacionadas con la baja prevalencia de Pestivirus encontrada en el ganado bovino marismeño del PND.

La ausencia de anticuerpos en ciervo y gamo sugiere que estas especies no parecen tener un papel importante en la epidemiología de los Pestivirus en el PND. Los resultados coinciden con el estudio publicado por Paniagua y cols. (2016) quienes obtuvieron tan sólo un ciervo positivo de los 1442 rumiantes silvestres analizados en 65 cotos distintos del sur de España. En Andalucía, no se ha observado mortalidad

compatible con Pestivirus en artiodáctilos silvestres hasta la fecha. Sin embargo, la ausencia de contacto con estos virus en las poblaciones silvestres y la circulación en el ganado doméstico podría suponer un riesgo importante en caso de introducción de estos patógenos en una población de artiodáctilos silvestres no protegida (Paniagua y cols., 2016). Nuestros resultados son igualmente consistentes con los encontrados en ciervo y gamo en el norte de España y en otros países europeos (Tabla 4). Sin embargo, Rodríguez-Prieto y cols. (2016) detectaron una prevalencia de Pestivirus próxima al 20% en ciervos en el centro de España. Estos autores asociaron la elevada prevalencia con la sobreabundancia de ciervo y la interacción con ganado bovino infectado en la región. No obstante, dado que no pudieron confirmar que una misma cepa fuese la causante de infección tanto en domésticos como en silvestres, no pudieron descartar la existencia de ciclos epidemiológicos independientes.

| CIERVO | | | | |
|------------------------|------------|---------------------|----------------|-----------------------------|
| País (Región) | Año | Diagnóstico | +/n (%) | Autores |
| <i>España (SO)</i> | 2016 | ELISA p80/125 + TSV | 0/101 (0) | <i>Presente trabajo</i> |
| España (S) | 2016 | ELISA p80 + TSV | 1/892 (0,1) | Paniagua y cols. |
| España (C) | 2016 | ELISA p80 | 52/267 (19,5) | Rodríguez-Prieto y cols. |
| España (NO) | 2011 | ELISA p80/125 | 1/56 (1,8) | Marco y cols. |
| Alemania (NO) | 2006 | ELISA | 0/79 (0) | Frölich y cols. |
| Austria (S) | 2004 | ELISA + TSV | 1/59 (1,7) | Krametter-Froetscher y cols |
| Dinamarca | 2000 | ELISA + TSV | 3/77 (3,9) | Nielsen y cols |
| Italia (NO) | 2005 | ELISA NS3 | 8/136 (5,9) | Riekerink y cols. |
| Noruega (CO) | 2003 | ELISA p80/125 + TSV | 7/658 (1,1) | Lillehaug y cols. |
| República Checa | 2009 | ELISA | 2/305 (0,6) | Sedlak y cols. |
| Suiza (S) | 2012 | ELISA | 3/261 (1,1) | Causabon y cols. |
| Suiza (C) | 2012 | ELISA | 3/98 (3,1) | Causabon y cols. |
| Suiza (N) | 2012 | ELISA | 7/117 (6) | Causabon y cols. |
| GAMO | | | | |
| País (Región) | Año | Diagnóstico | +/n (%) | Autores |
| <i>España (SO)</i> | 2016 | ELISA p80/125 + TSV | 0/102 (0) | <i>Presente trabajo</i> |
| España (S) | 2016 | ELISA p80 + TSV | 0/274 (0) | Paniagua y cols. |
| España (NO) | 2011 | ELISA p80/125 | 0/29 (0) | Marco y cols. |
| Alemania (NO) | 2006 | ELISA | 0/46 (0) | Frölich y cols. |
| Austria (S) | 2004 | ELISA + TSV | 0/4 (0) | Krametter-Froetscher y cols |
| Dinamarca | 2000 | ELISA + TSV | 0/20 (0) | Nielsen y cols |
| República Checa | 2009 | ELISA | 0/63 (0) | Sedlak y cols. |

Tabla 4. Comparación de los principales estudios de seroprevalencia de Pestivirus en ciervo y gamo en Europa (N; norte, S; sur, E; este, O; oeste y C; centro)

El TSV mostró resultados positivos frente a los tres Pestivirus incluidos en el análisis (*Tabla 3*). Estos títulos podrían estar asociados a infecciones mixtas o, más probablemente, a reacciones inmunológicas cruzadas entre Pestivirus. Los títulos más elevados se detectaron frente al VDVB-1. De hecho, uno de los animales presentó un título frente a VDVB-1 tres veces superior al resto de virus analizados, indicando que una cepa de genotipo 1 del VDVB podría ser la responsable de las infecciones por pestivirus en el PND (OIE, 2008). Nuestros resultados están en concordancia con los datos aportados por estudios previos en otras regiones de España y Europa (Arias y cols., 2003; Hurtado y cols., 2004; Lindberg y cols., 2006; Fernández-Aguilar y cols., 2016; Rodríguez-Prieto y cols., 2016) y sugieren que el Pestivirus predominante en el área de estudio es el VDVB-1.

Tan sólo un 9,7% (3 de 31) de las muestras positivas a bELISA se confirmaron por TSV. El TSV se emplea en la mayoría de estudios epidemiológicos como técnica “gold” estándar para la confirmación de los resultados de bELISA (OIE, 2015). Por tanto, las 28 muestras positivas a bELISA y negativas a TSV se consideraron como falsos positivos. Estos resultados podrían deberse a varios factores: la técnica bELISA empleada se encuentra validada en rumiantes domésticos, con una correlación del 95% con el “gold” estándar (TSV) (Valdazo-González y Álvarez-Martínez, 2003), por lo que el empleo de sueros de rumiantes silvestres podría alterar los valores de especificidad. Además, el TSV fue realizado con las cepas de Pestivirus más frecuentemente detectadas en rumiantes domésticos en España (Vega y cols., 2002; Marco y cols., 2009; Paniagua y cols., 2016). La circulación de diferentes cepas de Pestivirus en fauna silvestre con una limitada reacción cruzada con las utilizadas en el presente estudio (VDVB-1, VDVB-2 y VEF-4) podría originar resultados negativos en el TSV. La detección de Pestivirus y su posterior aislamiento o secuenciación permiten realizar el TSV con la cepa o cepas que circulan en la zona concreta. Desafortunadamente, en nuestro estudio todas las muestras resultaron negativas a RT-PCR, no pudiéndose realizar aislamiento vírico.

Las bajas seroprevalencias obtenidas, así como la ausencia de detección de ARN en las muestras analizadas, sugieren que la presencia de anticuerpos en los tres animales está más asociada a una infección antigua que a la presencia de IPIs en las explotaciones. De hecho, los animales seropositivos fueron vacas adultas mayores de 6 años. En este sentido, Collins y cols. (2009) describen que los títulos de anticuerpos

específicos frente a Pestivirus se incrementan continuamente en sangre hasta el día 105 post infección. Sin embargo, teniendo en cuenta que la prevalencia de IPIs es aproximadamente un 1% (Nettleton, 1995), la ausencia de animales positivos a RT-PCR podría estar asociada a un número de muestras analizadas insuficientes, dado que el muestreo (mínimo de 20 animales por especie y finca) se diseñó para determinar la presencia de enfermedad con una prevalencia mínima del 15% y un intervalo de confianza del 95% (Thursfield, 2001).

La información recopilada mediante la encuesta epidemiológica permitió caracterizar la zona de estudio, no resultando útil en este caso para el análisis de posibles factores de riesgo, dadas las bajas prevalencias obtenidas. No obstante, los datos obtenidos resultarán igualmente válidos para el estudio de otros procesos compartidos entre rumiantes domésticos y silvestres en el PND que se lleven a cabo durante el presente año.

8. CONCLUSIONES

1. La prevalencia obtenida indica una limitada circulación de Pestivirus en el ganado bovino en el PND. Los resultados serológicos sugieren que el Pestivirus que circula en el ganado doméstico en la zona de estudio es el genotipo 1 del VDVB.
2. La ausencia de rumiantes silvestres seropositivos indica que estas especies no representan actualmente un riesgo en la transmisión de Pestivirus para el ganado doméstico en el PND. Aunque nuestros resultados señalan la existencia de un ciclo epidemiológico independiente de Pestivirus en el ganado bovino, la presencia de poblaciones de rumiantes silvestres no protegidas podría favorecer la aparición de brotes y animales persistentemente infectados tras la introducción de un Pestivirus en el PND.

9. AGRADECIMIENTOS

A Ignacio García Bocanegra y María de los Ángeles Risalde Moya, los ~~directores~~ “jefes”. Por su eficaz dirección, su inconformismo y confianza... y por todo lo que ~~he~~ ~~aprendido~~ me han enseñado durante la realización de este trabajo, profesional y personalmente.

A la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la Universidad de Córdoba, por la ayuda concedida correspondiente a la Modalidad V: Semillero de Emprendedores del I Plan Propio Galileo, para realizar el Trabajo de Fin de Máster (TFM) en el seno de la empresa SABIOTEC (1400€).

A SABIOTEC (Transferencia Tecnológica en Sanidad y Biotecnología) y Mariana Boadella, por abrirme sus puertas y las del Parque Nacional de Doñana para el desarrollo de este trabajo y por todas las gestiones administrativas.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, mi ~~segunda~~ casa durante este año, por continuar con mi formación profesional desde un punto de vista investigador. Especialmente a los compañeros ~~de trabajo en el departamento~~ “de fatigas”: David Cano, Carlos Expósito, Jorge Paniagua, Inma Cuevas y Antonio Arenas (Jr), por el apoyo incondicional.

A Christian Gortázar, por facilitarme la realización de prácticas en el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) en Ciudad Real durante el Grado de Veterinaria, conociendo entonces al futuro equipo de muestreo: José Ángel Barasona, Eladio Gómez, Jordi Martínez, Roxana Triguero y Eduardo Laguna; y al (si Dios quiere) futuro director de mi tesis doctoral, Joaquín Vicente Baños.

A los compañeros del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA) y del Servicio de Ecopatología de Fauna Silvestre (SEFaS) en Barcelona, Ignasi Marco, Andreu Colom y especialmente a Óscar Cabezón, por la realización de los TSV y las RT-PCR.

A los ganaderos del PND, a José Antonio Muriel y al Personal del Programa de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (PVE) por ~~permitir llevar a cabo el muestreo~~ los maravillosos días pasados “en el Parque”.

A mi familia, sobre todo a Cris, por aguantar con perseverancia tanto los picos de estrés como las anécdotas e historias después de días y días trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo P, Farfán MA, Márquez AL, Delibes-Mateos M, Real R and Vargas JM (2011). Past, present and future of wild ungulates in relation to changes in land use. *Landsc Ecol*, 26(1): 19-31.
- Aduriz G, Atxaerandio R and Cortabarria N (2015). First detection of bovine viral diarrhoea virus type 2 in cattle in Spain. *Vet Rec Open*, 2(1): e000110.
- Alba A, Allepuz A, Serrano E and Casal J (2008). Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and Pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Ruminant Res*, 78(1): 80-86.
- Álvarez M, González M, Álvarez F, López JM, Llamazares J (1994). Prevalencia de las infecciones por el virus de la diarrea vírica bovina (DVB) en rebaños vacunos lecheros y su posible participación en problemas reproductivos. VII Jornadas Internacionales de Reproducción, Murcia.
- Arenas-Montes A, García-Bocanegra I, Paniagua J, Franco JJ, Miró F, Fernández-Morente M, Carbonero A and Arenas A (2013). Blood sampling by puncture in the cavernous sinus from hunted wild boar. *Eur J Wildl Res*, 59: 299-303.
- Arias P, Orlich M, Prieto M, Rosales SC, Thiel HJ, Álvarez M and Becher P (2003). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet Microbiol*, 96(4): 327-336.
- Arnal M, Fernandez-de-Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilček Š and Nettleton PF (2004). A novel Pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Gen Virol*, 85(12): 3653-3657.
- Bachofen C, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Stalder H and Peterhans E (2010). Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol*, 141(3): 258-267.
- Barasona JA, Latham MC, Acevedo P, Armenteros JA, Latham ADM, Gortázar C, Carro R, Soriguer R and Vicente J (2014). Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Vet Res*, 45(1): 122.
- Baudeau F, Belloc C, Seegers H, Assie S, Pourquier P and Joly A (2001). Informative value of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48(9): 705-712.
- Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R and Flores EF (2013). HoBi-like viruses an emerging group of Pestiviruses. *J Vet Diagn Invest*, 25(1): 6-15.
- Bauermann FV and Ridpath JF (2015). HoBi-like viruses—the typical ‘atypical bovine Pestivirus’. *Anim Health Res Rev*, 16(01): 64-69.
- Becher P, König M, Paton DJ and Thiel HJ (1995). Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus Pestivirus. *Virology*, 209(1): 200-206.
- Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G and Thiel HJ (1997). Phylogenetic analysis of Pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol*, 78(6): 1357-1366.
- Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M and Thiel HJ (1999). Genetic diversity of Pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262(1): 64-71.
- Becher P, Ramirez RA, Orlich M, Rosales SC, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrneier H and Thiel HJ (2003). Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1): 96-104.
- Berriatua E, Barandika J, Aduriz G, Atxaerandio R, Garrido J and García-Pérez AL (2004). Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Vet J*, 168(3): 336-342.
- Berry DP (2014) Genetics of bovine respiratory disease in cattle: can breeding programs reduce the problem? *Anim Health Res Rev*, 15(2):151-6.

- Bolin SR and Grooms DL (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20: 51-68.
- Borchers K, Brackmann J, Wolf O, Rudolph M, Glatzel P, Krasinska M, Krasinski ZA and Frölich K (2002). Virologic investigations of free-living European bison (*Bison bonasus*) from the Bialowieza Primeval Forest, Poland. *J Wildl Dis*, 38(3): 533-538.
- Bregoli M, Dellamaría D, Francione E, Di Giusto T, Clapiz L, Passera A, Cocchi M, Ceglie L, Citterio C and Trevisiol K (2012). Prevalence of antibodies against Pestiviruses in wild and domestic ruminants in north-eastern Italy. WDA Conference; Lyon: 2012.
- Brock KV (2004). The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1): 1-3.
- Buttke DE, Decker DJ and Wild MA (2015). The role of one health in wildlife conservation: a challenge and opportunity. *J Wildl Res*, 51(1): 1-8.
- Cabezón O, Rosell R, Sibila M, Lavín S, Marco I and Segalés J (2010). Experimental infection of pigs with Border disease virus isolated from Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *J Vet Diagn Invest*, 22(3): 360-365.
- Carman S, van Dreumel T, Ridpath JF, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A and Anderson N (1998). Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagn Invest*, 10(1): 27-35.
- Casaubon J, Vogt HR, Stalder H, Hug C and Ryser-Degiorgis MP (2012). Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet Res*, 8(1): 204.
- Castillo L, Fernández-Llario P, Mateos C, Carranza J, Benítez-Medina JM, García-Jiménez W and Hermoso de Mendoza J (2011). Management practices and their association with Mycobacterium tuberculosis complex prevalence in red deer populations in South western Spain. *Prev Vet Med*, 98(1): 58-63.
- Chappuis G, Brun A, Kato F, Dauvergne M, Reynaud G and Duret C. Études sérologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un Pestivirus dans un foyer ovin chez des moutons de l'Aveyron. In: Espinasse J and Savey M, eds. Pestivirose des ovins et des bovins: Nouvelles connaissances, utilisation pour une stratégie de contrôle, journées nationales de la Société Française de Buiatrie et de son groupe d'étude sur la pathologie des ovins et des caprins (GEPOC). Paris, Société Française de Buiatrie; 1986: 55-65.
- Coker R, Rushton J, Mounier-Jack S, Karimuribo E, Lutumba P, Kambarage D, Pfeiffer DU, Stärk K and Rweyemamu M (2011). Towards a conceptual framework to support one-health research for policy on emerging zoonoses. *Lancet Infect Dis*, 11(4): 326-331.
- Collins ME, Heaney J, Thomas CJ and Brownlie J (2009). Infectivity of Pestivirus following persistence of acute infection. *Vet Microbiol*, 138(3): 289-296.
- Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ and Ridpath JF (2005). Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol*, 42: 192-9.
- Couvreur B, Letellier C, Collard A, Quenon P, Dehan P, Hamers C, Pastoret PP and Kerkhofs P (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res*, 85(1): 17-28.
- Cranwell MP, Otter A, Errington J, Hogg RA, Wakeley P and Sandvik T (2007). Detection of Border disease virus in cattle. *Vet Rec*, 161(6): 211-212.
- Danuser R, Vogt HR, Kaufmann T, Peterhans E and Zanoni R (2009). Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 151(3): 109-117.
- Delibes-Mateos M, Farfán MA, Olivero J, Márquez AL and Vargas JM (2009). Longterm changes in game species over a long period of transformation in the Iberian Mediterranean landscape. *Environ Manage*, 43(6): 1256-1268.

- Deregt D and Loewen KG (1995). Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can Vet J*, 36(6): 371.
- Dhama K, Chakraborty S, Kapoor S, Tiwari R, Kumar A, Deb R, Rajagunalan S, Singh R, Vora K and Natesan S (2013). One world, one health-veterinary perspectives. *Adv Anim Vet Sci*, 1(1): 5-13.
- Dubois E, Russo P, Prigent M and Thiéry R (2008). Genetic characterization of ovine Pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol*, 130(1): 69-79.
- Duncan C, Ridpath JF, Palmer MV, Driskell E and Spraker T (2008). Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 20(3): 289-296.
- EBD, Estación Biológica de Doñana - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2014). Memoria 2014. <http://www.ebd.csic.es/documents/10184/22116/Memoria+EBD+2014/ba621f08-2501-4fa5-beef-e9b3ed05bbc6>.
- Eiras C, Arnaiz I, Sanjuán ML, Yus E and Diéguez FJ (2012). Bovine viral diarrhoea virus Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody levels using 4 commercial immunoassays. *J Vet Diagn Invest*, 24(3): 549-553.
- Espacio Natural Doñana, (2000). Plan de Aprovechamiento Ganadero Del Parque Nacional de Doñana. <http://docplayer.es/11102940-Plan-de-aprovechamiento-ganadero-del-parque-nacional-de-donana-indice-objetivos-y-diretrizes-generales-del-plan.html>.
- Espunyes J (2014). Epidemiología de pestivirus en ungulados silvestres y su relación con el ganado doméstico en ecosistemas mediterráneos del sur de España. Trabajo de Fin de Máster. Máster en gestión de fauna silvestre. Universidad de Murcia.
- Falconi C, Oleaga Á, López-Olvera JR, Casais R, Prieto M and Gortázar C (2010). Prevalence of antibodies against selected agents shared between Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) and domestic goats. *Eur J Wildl Res*, 56(3): 319-325.
- Farfán MA, Guerrero JC, Real R, Márcia A and Vargas M (2004). Caracterización del aprovechamiento cinegético de los mamíferos en Andalucía. *Galemys*, 16 (1): 41-59.
- Fernández-Aguilar X, López-Olvera JR, Marco I, Rosell R, Colom-Cadena A, Soto-Heras S, Lavín S and Cabezón O (2016). Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. *Vet Rec*, 178(23): 586-586.
- Fernández-Sirera L, Mentaberre G, López-Olvera JR, Cuenca R, Lavín S and Marco I (2011). Haematology and serum chemistry of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) naturally infected with a border disease virus. *Res Vet Sci*, 90(3): 463-467.
- Fernández-Sirera L, Riba L, Cabezón O, Rosell R, Serrano E, Lavín S and Marco I (2012). Surveillance of border disease in wild ungulates and an outbreak in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Andorra. *J Wildl Dis*, 48(4): 1021-1029.
- Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS and Gil LH (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res*, 87(1): 51-60.
- Frölich K and Hofmann M (1995). Isolation of bovine viral diarrhoea virus-like Pestiviruses from roe deer (*Capreolus capreolus*). *J Wildl Dis*, 31(2): 243-246.
- Frölich K, Thiede S, Kozikowski T and Jakob W (2002). A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. *Ann N Y Acad Sci*, 969(1): 4-13.
- Frölich K, Hamblin C, Parida S, Tuppurainen E and Schettler E (2006). Serological survey for potential disease agents of free-ranging cervids in six selected national parks from Germany. *J Wildl Dis*, 42(4): 836-843.
- Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman RG, Bolin SR, Ridpath JF and Payton ME (2000). Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest*, 12(1): 33-38.

- Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ and Payton ME (2005). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol*, 111(1): 35-40.
- Garrido JL. Valoración por subsectores. In: Garrido JL, ed. *La caza. Sector económico*. Madrid, FEDENCAEEC; 2012: 24.
- Giammarioli M, La Rocca SA, Steinbach F, Casciari C and De Mia GM (2011). Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet Microbiol*, 147(3): 231-236.
- Giangaspero M and Harasawa R (2004). Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated from sheep. *J Vet Med Sci*, 66(3): 323-326.
- Gómez-Pacheco JM, González MA, Luque-Moreno I, Arenas-Casas A, Maldonado-Borrego JL and Tarradas-Iglesias C (2009). Seroprevalencia de las infecciones por el virus Diarrea Vídrica Bovina en ganado bovino en Andalucía. *RedVet*, 10(2).
- Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F and Vicente J (2006). Disease risks and overabundance of game species. *Eur J Wildl Res*, 52(2): 81-87.
- Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K and Vicente J (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wildl Res*, 53(4): 241-256.
- Gortázar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, De la Fuente J, Negro JJ and Aznar-Martín J (2008). Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One*, 3(7): e2776.
- Gortázar C, Ferroglio E, Lutton CE and Acevedo P (2010). Disease-related conflicts in mammal conservation. *Wildl Res*, 37(8): 668-675.
- Graham DA, Calvert V, German A and McCullough SJ (2001). Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec*, 148: 69-72.
- Grooms DL (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1): 5-19.
- Höfle U, Vicente J, Nagore D, Hurtado A, Peña A, Fuente JDL and Gortázar C (2004). The risks of translocating wildlife: pathogenic infection with *Theileria sp.* and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. *Vet Parasitol*, 126(4): 387-395.
- Houe H (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11(3): 521-547.
- Houe H (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64(2): 89-107.
- Houe H, Lindberg A and Moennig V (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest*, 18(5): 427-436.
- Humphry RW, Brülisauer F, McKendrick IJ, Nettleton PF and Gunn GJ (2012). Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and associated risk factors in Scottish dairy herds. *Vet Rec*, 171(18): 445-445.
- Hurtado A, García-Pérez AL, Aduriz G and Juste RA (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res*, 92(1): 67-73.
- Hurtado A, Aduriz G, Gómez N, Oporto B, Juste RA, Lavín S, Jorge R, López-Olvera JR and Marco I. (2004). Molecular identification of a new Pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J Wildl Dis*, 40(4): 796-800.
- INE Instituto Nacional de Estadística (2014). Cifras de población y Censos demográficos; http://www.ine.es/inebmenu/mnu_cifraspob.htm
- Jiménez-Ruiz S, Arenas-Montes A, Cano-Terriza D, Paniagua J, Pujols J, Miró F, Fernández-Aguilar X, González MA, Franco JJ and García-Bocanegra I. Assessment of the blood extraction method by endocranial venous sinuses puncture in hunted wild ruminants. Enviado.

- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL and Daszak P (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181): 990-993.
- Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca (2008). Memoria anual de aprovechamiento ganadero año 2008. <http://www.juntadeandalucia.es/agenciaagrariaypesquera/portal/ishare-frontend-portlet/content/39879ce1-08e2-455e-9c01-e13209a9c396>.
- Kircheggssner MS, Dubovi EJ and Whipps CM (2013). Spatial point pattern analyses of Bovine viral diarrhoea virus infection in domestic livestock herds and concomitant seroprevalence in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York State, USA. *J Vet Diagn Invest*, 25(2): 226-233.
- Kóvágó C, Forgách P, Szabára Á, Mándoki M, Hornyák Á, Duignan C, Gere EP and Rusvai M (2015). Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus in Hungary - situation before launching an eradication campaign. *Acta Vet Hung*, 63(2): 255-263.
- Krametter-Froetscher R, Nielsen SS, Loitsch A, Froetscher W, Benetka V, Moestl K and Baumgartner W (2004). Pestivirus exposure in free-living and captive deer in Austria. *J Wildl Dis*, 40(4): 791-795.
- Krametter-Froetscher R, Loitsch A, Kohler H, Schleiner A, Schiefer P, Moestl K, Golja F and Baumgartner W (2007). Serological survey for antibodies against Pestiviruses in sheep in Austria. *Vet Rec*, 160(21): 726-730.
- Kukielka E, Barasona JA, Cowie CE, Drewe JA, Gortázar C, Cotarelo I and Vicente J (2013). Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev Vet Med*, 112(3): 213-221.
- Kuta A, Polak MP, Larska M and Żmudziński JF (2013). Monitoring of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in Polish dairy herds using bulk tank milk samples. *Bull Vet Inst Pulawy*, 57(2): 149-156.
- Liebler-Tenorio EM, Lanwehr A, Greiser-Wilke I, Loehr BI and Pohlenz J (2000). Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet Microbiol*, (1): 163-174.
- Lillehaug A, Vikøren T, Larsen IL, Åkerstedt J, Tharaldsen J and Handeland K (2003). Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J Wildl Dis*, 39(4): 779-786.
- Lindberg A, Groenendaal H, Alenius S and Emanuelson U (2001). Validation of a test for dams carrying fetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev Vet Med*, 51(3): 199-214.
- Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T and Valle PS (2006). The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 25(3): 961-979.
- Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S and Baule C (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into Pestiviruses. *Virology*, 385(2): 351-357.
- Luzzago C, Piccinini R, Zepponi A and Zecconi A (1999). Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. *Vet Microbiol*, 64(2): 247-252.
- Luzzago C, Lauzi S, Ebranati E, Giammarioli M, Moreno A, Cannella V, Masoero L, Canelli E, Guercio A, Carusso C, Cicozzi M, De Mia GM, Acutis PL, Zehender P and Peletto S (2014). Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed Res Int*, 2014: 0-8.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2016). Parque Nacional de Doñana. <http://www.magrama.gob.es/es/red-parques-nacionales/nuestros-parques/donana>
- Mainar-Jaime RC and Vázquez-Boland JA (1999). Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Prev Vet Med*, 40(3): 193-205.
- Mainar-Jaime RC, Berzal-Herranz B, Arias P and Rojo-Vazquez FA (2001). Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Prev Vet Med*, 52(1): 63-73.

- Mao L, Li W, Zhang W, Yang L and Jiang J (2012). Genome sequence of a novel Hobi-like Pestivirus in China. *J Virol* 86(22): 12444-12444.
- Marco I, López-Olvera JR, Rosell R, Vidal E, Hurtado A, Juste R, Pumarola M and Lavín S (2007). Severe outbreak of disease in the Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Vet Microbiol*, 120(1): 33-41.
- Marco I, Rosell R, Cabezón O, Mentaberre G, Casas E, Velarde R, López-Olvera JR, Hurtado A and Lavín S (2008). Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Vet Microbiol*, 127(1): 29-38.
- Marco I, Rosell R, Cabezón O, Beneria M, Mentaberre G, Casas E, Hurtado A, López-Olvera JR and Lavín S (2009). Serologic and virologic investigations into Pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). *Res Vet Sci*, 87(1): 149-153.
- Marco I, Cabezón O, Rosell R, Fernández-Sirera L, Allepuz A and Lavín S (2011). Retrospective study of Pestivirus infection in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain). *Vet Microbiol*, 149(1): 17-22.
- Marin J (1997). IBR y BVD. Seroprevalencia en animales con trastornos reproductivos. Análisis, evolución y situación actual en Extremadura. *Rev Prod Animal* 119: 2-17
- Martin C, Letellier C, Caij B, Gauthier D, Jean N, Shaffii A and Saegerman C (2011). Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Vet Microbiol*, 147(3): 320-328.
- Martin C, Duquesne V, Guibert JM, Pulido C, Gilot-Fromont E, Gibert P, Velarde R, Thiéry R, Marco I and Dubois E (2013). Experimental infection of pregnant Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) with border disease virus subtype 4. *J Wildl Dis*, 49(1): 55-68.
- Martin C, Duquesne V, Adam G, Belleau E, Gauthier D, Champion JL, Saegerman C, Thiéry R and Dubois E (2015). Pestiviruses infections at the wild and domestic ruminants interface in the French Southern Alps. *Vet Microbiol*, 175(2): 341-348.
- Martín SW, Meek AH and Willeberg P. *Veterinary epidemiology: principles and methods*. 1st ed. Iowa State, University Press; 1987.
- Meyers G and Thiel HJ (1996). Molecular characterization of Pestiviruses. *Adv Virus Res*, 47: 53-118.
- Miller RS, Farnsworth ML and Malmberg JL (2013). Diseases at the livestock-wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. *Prev Vet Med*, 110(2): 119-132.
- Moennig V and Liess B (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11(3): 477-487.
- Molina V, Risalde MA, Sánchez-Cordón PJ, Romero-Palomo F, Pedrera M, Garfia and Gómez-Villamandos JC (2014). Cell-mediated immune response during experimental acute infection with bovine viral diarrhoea virus: evaluation of blood parameters. *Transbound Emerg Dis*, 61(1): 44-59.
- Nettleton PF and Entrican G (1995). Ruminant Pestiviruses. *Br Vet J*, 151(6): 615-642.
- Nettleton PF. Border disease. In: Martin WB and Aitken ID, eds. *Diseases of sheep*. London, Blackwell Science; 2000: 95-102.
- Nettleton PF and Willoughby K. Border disease. In: Aitken ID, ed. *Diseases of sheep*. 4th ed. Edinburgh, Blackwell Publishing; 2007(32): 119.
- Nielsen SS, Roensholt L and Bitsch V (2000). Bovine virus diarrhea virus in free-living deer from Denmark. *J Wildl Dis*, 36(3): 584-587.
- Niza-Ribeiro J, Pereira A, Souza J, Madeira H, Barbosa A and Afonso C (2005). Estimated BVDV-prevalence, -contact and -vaccine use in dairy herds in Northern Portugal. *Prev Vet Med*, 72(1): 81-85.
- OIE, World Organization for Animal Health (2008). *Classical Swine Fever (hog cholera)*. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, Sixth ed. 2: 1092-1106.

- OIE, World Organisation for Animal Health (2015). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals>.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal (2016). Enfermedades de la Lista de la OIE 2016; <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016>
- Olafson P, MacCallum AD and Fox FH (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*, 36: 205.
- Olea L and San Miguel-Ayaz A (2006). The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. *Grassl Sci Eur*, 11: 3-13.
- O'Reilly LM and Daborn CJ (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 76: 1-46.
- Orsel K, Antonis AFG, Oosterloo JC, Vellema P and van der Meer FJUM (2009). Seroprevalence of antibodies against pestiviruses in small ruminants in The Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd*, 0: 0.
- Paniagua J, García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Berriatua E, Espunyes J, Carbonero A, Rosell R, Marco I and Cabezón O (2016). Absence of circulation of Pestivirus between wild and domestic ruminants in southern Spain. *Vet Rec*, 178(9): 215-215.
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Givens MD, Maxwell HS and Brock KV (2007). Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in white-tailed deer. *Vet Microbiol*, 122(3): 350-356.
- Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Brock KV, DeYoung RW, Foley AM and Givens MD (2009). Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus results in persistently infected fawns. *Vet Microbiol*, 134(3): 362-367.
- Passler T, Ditchkoff SS, Givens MD, Brock KV, DeYoung RW and Walz PH (2010). Transmission of bovine viral diarrhoea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res* 41(2): 1-8.
- Passler T and Walz PH (2010). Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev*, 11(2): 191-205.
- Paton DJ, Sands JJ, Lowings JP, Smith JE, Iyata G and Edwards S (1995). A proposed division of the Pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res*, 26(2): 92-109.
- Pellerin C, Van Den Hurk J, Lecomte J and Tijssen P (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203(2), 260-268.
- Pellerin C, Moir S, Lecomte J and Tijssen P (1995). Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet Microbiol*, 45(1): 45-57.
- Presi P, Struchen R, Knight-Jones T, Scholl S and Heim D (2011). Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland - experiences of the first two years. *Prev Vet Med*, 99(2): 112-121.
- Preyler-Theiner B, Krametter-Frötscher R, Theiner A, Tichy A, Möstl K and Baumgartner W (2009). Studies on the seroprevalence of pestivirus infections in the goat population of Vorarlberg (Austria). *Wien Tierarztl Monat*, 96(9/10): 232-239.
- Prieto M, Cármenes P and Álvarez M (1988). Prevalencia de los anticuerpos contra el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) y el herpesvirus bovino 1 (IBR-IPV) en el ganado vacuno lechero de la región asturiana (España). In: Proceedings of the XV World Buiatrics Congress, Palma de Mallorca, Spain; 896:11-14.
- Quiroz J, Martínez A, Marques J, Calderón J and Vega-Pla J (2007). Relación genética de la vaca Marismeña con algunas razas andaluzas. *Arch. Zootec*, 56(Supl 1): 449-454.
- Raizman EA, Pogranichniy R, Levy M, Negron M, Langohr I and Alstine WV (2009). Experimental infection of white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) with bovine viral diarrhoea virus type-1 isolated from free-ranging white-tailed deer. *J Wildl Dis*, 45(3): 653-660.

- Rezaeisaber AP, Nikniaz H and Davatgar-Badie A (2013). Comparison of bovine viral diarrhoea virus infection between sarabian and holstein dairy cows in relation to abortion. *Ann Biol Res*, 4: 88-91.
- Ridpath JF, Bendfeldt S, Neill JD and Liebler-Tenorio E (2006). Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res*, 118(1): 62-69.
- Ridpath JF, Mark CS, Chase CC, Ridpath AC and Neill JD (2007). Febrile response and decrease in circulating lymphocytes following acute infection of white-tailed deer fawns with either a BVDV1 or a BVDV2 strain. *J Wildl Dis*, 43(4): 653-659.
- Ridpath JF (2010). Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26(1): 105-121.
- Ridpath JF (2015). Emerging Pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts. *Anim Health Res Rev*, 16(1): 55-59.
- Riekerink RO, Dominici A, Barkema HW and De Smit AJ (2005). Seroprevalence of Pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Vet Microbiol*, 108(3): 297-303.
- Rodríguez-Prieto V, Kukielka D, Rivera-Arroyo B, Martínez-López B, de las Heras AI, Sánchez-Vizcaíno JM and Vicente J (2016). Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Vet Res*, 12(1): 1.
- Romero-Palomo F, Gómez-Villamandos JC, Risalde MA. Immunomodulation mechanisms developed by bovine viral diarrhoea virus and its role in the establishment of the bovine respiratory disease complex. In: *Advances in Medicine and Biology*. Nova Science Publishers; 2016: 95-142.
- Rondón-Barragán I (2006). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and immunopathology. *Rev MVZ Córdoba*, 11(1): 694-704.
- Rüfenacht J, Schaller P, Audige L, Knutti B, Küpfer U and Peterhans E (2001). The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. *Theriogenology*, 56(2): 199-210.
- Sáenz de Buruaga M, Lucio AJ and Purroy FJ. Reconocimiento de Sexo y Edad en Especies Cinegéticas. Rabanedo SA, ed., 1st ed. Spain, Ediciones Leonesas SA; 1991: 39.
- Sakoda Y, Ozawa SI, Damrongwatanapokin S, Sato M, Ishikawa K and Fukusho A (1999). Genetic heterogeneity of porcine and ruminant Pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet Microbiol*, 65(1): 75-86.
- Schirrneier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B and Beer M (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical Pestivirus isolate, a putative member of a novel Pestivirus species. *J Gen Mol Virol*, 85(12): 3647-3652.
- Schweizer M and Peterhans E (2014). Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci*, 2(1): 141-163.
- Sedlak K, Girma T and Holejsovsky J (2009). Pestivirus infections in cervids from the Czech Republic. *Vet Med (Praha)*, 54(4): 191-193.
- Simpson VR (2002). Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *Vet J*, 163(2): 128-146.
- Smirnova NP, Bielefeldt-Ohmann H, Van Campen H, Austin KJ, Han H, Montgomery DL, Shoemaker M, van Olphen AL and Hansen TR (2008). Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Res*, 132(1): 49-58.
- Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV and Bennett GL (2006). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci*, 84(8):1999-2008.
- Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR and Peterhans E (2005). Genetic heterogeneity of Pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med*, 72(1): 37-41.
- Tegtmeier C, Stryhn H, Uttentha I, Kjeldsen AM and Nielsen TK (1999). Seroprevalence of Border Disease in Danish sheep and goat herds. *Acta Vet Scand*, 41(4): 339-344.
- Tessaro SV, Carman PS and Deregt D (1999). Viremia and virus shedding in elk infected with type 1 and virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus. *J Wildl Dis*, 35(4): 671-677.

- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell R and Rice CM. Family flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA, eds. *Virus Taxonomy: Eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. London, Elsevier/Academic Press; 2005: 981-998.
- Thornton PK (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1554): 2853-2867.
- Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP and Frankena K (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*, 148(18): 567-572.
- Torres-Porras J, Carranza J and Pérez-González J (2009). Selective culling of Iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*) by selective montería in Spain. *Eur J Wildl Res*, 55(2): 117-123.
- Valdazo-González B and Álvarez-Martínez M (2003). 6th International Congress of Veterinary Virology, Saint Malo, Francia; 134.
- Valdazo-González B, Álvarez-Martínez M and Greiser-Wilke I (2006). Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet Microbiol*, 117(2): 141-153.
- Valdazo-González B, Álvarez M and Sandvik T (2008). Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. *Vet Microbiol*, 128(3): 269-278.
- Van Campen H, Frölich K and Hofmann M. Pestivirus infections. In: Williams ES and Barker IK, eds. *Infectious diseases of wild mammals*. 3rd ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press; 2001a: 232-244.
- Van Campen H, Ridpath JF, Williams E, Cavender J, Edwards J, Smith S and Sawyer H (2001b). Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis*, 37(2): 306-311.
- Van Campen H and Rhyan J (2010). The role of wildlife in diseases of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26(1): 147-161.
- Vega S, Rosell R, Orden JA, De la Fuente R, García A, Pérez T, Davis L, Wakeley P and Sandvik T (2002). Antigenic and molecular characterization of Border Disease Virus isolates from Spain. *Proceedings of the 5th Pestivirus Symposium*, Cambridge, UK: 102.
- Vega S, Orden JA, García A, Pérez T, Ruíz-Santa-Quitería J and De la Fuente R (2004). Seroprevalencia de anticuerpos frente al virus de la Diarrea vírica bovina en el ganado bovino de la Comunidad Autónoma de Madrid. *Laboratorio Veterinario ADEVILA*, 28:2-8.
- Vega S, Rosell R, Orden JA, Pérez T, Marín C, González S, Marco I, Cabezón O and de la Fuente R (2015). Antigenic and molecular characterisation of Border disease virus associated with high mortality in lambs in Spain. *Vet Rec Open*, 2(1): e000048.
- Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Acevedo P, Juste R, Barral M and Gortázar C (2007). Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet Res*, 38(3): 451-464.
- Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP and Paton DJ (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136(3-4): 309-323.
- Vilček Š and Belák S (1996). Genetic identification of Pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods*, 60(1): 103-108.
- Vilček Š, Nettleton PF, Paton DJ and Bel S (1997). Molecular characterization of ovine Pestiviruses. *J Gen Virol*, 78(4): 725-735.
- Vilček Š, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT and Palfi V (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol*, 146(1): 99-115.
- Vilček Š and Nettleton PF (2006). Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*, 116(1): 1-12.

Anexo I. Encuesta Epidemiológica.**MEJORA DE LA BIOSEGURIDAD DEL BOVINO EXTENSIVO****1. Datos personales**

Código REGA: _____ OCA: _____

Municipio: _____

Nombre ganadero/contacto: _____ Cargo: _____

Teléfono: _____ E-mail: _____

Veterinario responsable: _____ Teléfono: _____

ADSG a la que se pertenece: _____

2. Manejo del Ganado

Superficie Total Finca (has): _____

Superficie Ganadería (has o %): _____

Superficie Finca en contacto con ungulados silvestres (has o %): _____

Nº de cabezas de Bovino extensivo: 1-5 5-10 10-20 20-50 50-100 >100

Nº de cabezas el año pasado: 1-5 5-10 10-20 20-50 50-100 >100

Nº de cabezas hace 5 años: 1-5 5-10 10-20 20-50 50-100 >100

Razas: _____

Tipo de producción: leche carne lidia ecológica

Indicar otras especies domésticas presentes: Ovino Caprino Porcino Otro

Suplementación de alimento: SI NO

En caso afirmativo: heno ensilado unifeed tacos otro

Procedencia y almacenaje: _____

Gestión de Cadáveres: _____

Retirada oficial (___%), enterramiento (___%), carroñeros (___%), Muladar (___%)

3. Fauna silvestre

¿Presencia de fauna silvestre en contacto con el ganado? SI NO

En caso afirmativo: Superficie Finca en contacto con ganado (has o %): _____

Pastos Charcas Pastos y charcas Otro:

Suplementación de alimento: SI NO

En caso afirmativo: heno ensilado unifeed tacos otro:

Procedencia y almacenaje: _____

Avistamiento de ungulados silvestres: ACTUALIDAD

| Especie | Presencia | | | | | |
|---------|-----------|---------|---------|------------|-------|--------------|
| | Diaria | Semanal | Mensual | Esporádica | Nunca | Localización |
| Ciervo | | | | | | |
| Gamo | | | | | | |
| Jabalí | | | | | | |

Avistamiento de ungulados silvestres: AÑO PASADO

| Especie | Presencia | | | | | |
|---------|-----------|---------|---------|------------|-------|--------------|
| | Diaria | Semanal | Mensual | Esporádica | Nunca | Localización |
| Ciervo | | | | | | |
| Gamo | | | | | | |
| Jabalí | | | | | | |

Avistamiento de ungulados silvestres: HACE 5 AÑOS

| Especie | Presencia | | | | | |
|---------|-----------|---------|---------|------------|-------|--------------|
| | Diaria | Semanal | Mensual | Esporádica | Nunca | Localización |
| Ciervo | | | | | | |
| Gamo | | | | | | |
| Jabalí | | | | | | |

Observaciones: _____

4. Datos sanitarios**A) GANADO BOVINO**

| | | | | |
|--------------------|--|--|--|--|
| Vacunación: | | | | |
| Frecuencia: | | | | |
| Última vacunación: | | | | |

| | | | | |
|-------------------------|--|--|--|--|
| Desparasitación: | | | | |
| Frecuencia: | | | | |
| Última desparasitación: | | | | |

¿Movimientos de animales? SI NO

En caso afirmativo:

Fecha de la última entrada: _____

Número de animales: _____

Procedencia: _____

¿Historial sanitario? _____

¿Movimiento de animales el año pasado? SI NO

¿Movimiento de animales en los últimos 5 años? SI NO

¿Algún bovino tuberculoso en el último saneamiento ganadero? SI NO N° _____

¿Algún otro problema sanitario actualmente? SI NO

¿Cuál/Cuáles? Digestivo Respiratorio Reproductivo Otro:

¿Tratamiento? ¿Cuál? _____

¿Algún bovino tuberculoso en los saneamientos ganaderos anteriores? SI NO N°

¿Algún otro problema sanitario el año pasado? SI NO Tipo:

¿Algún bovino tuberculoso en los últimos 5 años? SI NO N°

¿Algún otro problema sanitario en los últimos 5 años? SI NO Tipo:

B) UNGULADOS SILVESTRES:

¿Se está realizando algún control de enfermedades? SI NO NS/NC

Descripción: _____

Anexo II. Actividad científica durante el transcurso del Máster.**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS:**

1. **Jiménez-Ruiz S.**, Arenas-Montes A., Cano-Terriza D., Paniagua J., Pujols J., Miró F., Fernández-Aguilar X., González MA., Franco JJ., García-Bocanegra I. (2016) Assessment of the blood extraction method by endocranial venous sinuses puncture in hunted wild ruminants. *Eur J Wild Res.* Enviado.
2. Cano-Terriza D., Puig-Ribas M., **Jiménez-Ruiz S.**, Cabezón Ó., Almería S., Galán-Relaño Á., Dubey JP., García-Bocanegra I. (2016) Risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in hunting, pet and watch dogs from southern Spain and northern Africa. *Parasitol Int.* 2016 May 4. pii: S1383-5769(16)30035-6. doi: 10.1016/j.parint.2016.05.001 Position in the category: 16/36 (T2).

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:

1. Epidemiology of Bovine Tuberculosis in domestic livestock in Spain: Role of domestic and wild reservoirs and evaluation of control measures. **Equipo de Trabajo.**
2. Epidemiology and development of specific protocols to mitigate the risk of transmission of diseases shared between ungulates in the central and southern Spain. **Equipo de Trabajo**

CONGRESOS, WORKSHOPS Y ENCUENTROS CIENTÍFICOS:

1. VII Reunión de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI VII). Septiembre 2016. Cáceres (España). COMUNICACIÓN ORAL. Situación epidemiológica de Pestivirus en el Parque Nacional de Doñana: evaluación de la interacción entre rumiantes domésticos y silvestres. **Jiménez-Ruiz S.**, García-Bocanegra I., Risalde MA., Cabezón O., Cano-Terriza D., J.A. Barasona, I. Marco, A. Colom-Cadena, Vicente J.
2. VII Reunión de Ungulados Silvestres Ibéricos (RUSI VII). Septiembre 2016. Cáceres (España). COMUNICACIÓN PÓSTER. Serosurvey of Aujeszky's disease virus in hunting dogs from Southwestern Spain. Cano-Terriza D., Martínez R., Moreno A., Pérez-Martín J.E., **Jiménez-Ruiz S.**, Ruiz-Fons F., Arenas A., García-Bocanegra I.
3. 34èmes rencontres du Groupe d'Etudes sur l'Eco-pathologie de la Faune Sauvage de Montagne (GEEFSEM). Septiembre 2016. Bearne (Francia). COMUNICACIÓN ORAL. Estudio comparativo de la prevalencia de Tuberculosis Bovina en suidos domésticos y silvestres en el Sur de España. Cano-Terriza D., Risalde M.A., Vicente J., Napp S., Allepuz A., **Jiménez-Ruiz S.**, Paniagua J., García-Bocanegra I.

4. 34èmes rencontres du Groupe d'Etudes sur l'Eco-pathologie de la Faune Sauvage de Montagne (GEEFSEM). Octubre 2016. Bearne (Francia). COMUNICACIÓN ORAL. Estudio epidemiológico del Virus de Schmallenberg en ungulados silvestres en el Sur de España. Expósito-Cárdenas C., Cano-Terriza D., Pujols J., Rosell R., **Jiménez-Ruiz S.**, Paniagua J., Cabezón O., García-Bocanegra I.
5. 12th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA). Agosto 2016. Berlín (Alemania). COMUNICACIÓN PÓSTER. Absence of Rift Valley Fever Virus in wild and domestic ruminants from Spain. García-Bocanegra I., Paniagua J., Cano-Terriza D., Arenas-Montes A., **Jiménez-Ruiz S.**, Camacho L., Fernández-Morente M., Napp S.
6. I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Febrero 2016. Córdoba. España. COMUNICACIÓN ORAL. Evaluación del método de extracción de sangre mediante punción del seno cavernoso de la duramadre en rumiantes silvestres. **Jiménez-Ruiz S.**, Cano-Terriza D., Arenas-Montes A., Paniagua J., Cabezón O., Miró F., Carbonero A., Arenas A., García-Bocanegra I.
7. I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Febrero 2016. Córdoba. España. COMUNICACIÓN PÓSTER. Prevalencia de anticuerpos frente a virus Influenza y Flavivirus en pollos de gaviota patiamarilla (*Larus michaelis*) en España. Jurado-Tarifa E., Cerdá-Cuèllar M., Cano-Terriza D., **Jiménez-Ruiz S.**, Borge C., García-Bocanegra I.
8. I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Febrero 2016. Córdoba. España. COMUNICACIÓN PÓSTER. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a *Mycobacterium bovis* en ungulados silvestres de Sierra Morena. Cano-Terriza D., Paniagua J., Arenas-Montes A., **Jiménez-Ruiz S.**, Jurado-Tarifa E., Cuevas-Gómez I., Borge C., García-Bocanegra I.

BECAS Y RECONOCIMIENTOS:

1. Beca Semillero de emprendedores. Modalidad V del I Plan Propio Galileo de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la Universidad de Córdoba. Beca de Especialización para el desarrollo del trabajo de fin de máster (TFM) en el seno de una empresa. (2015-2016).
1. Beca de Excelencia Académica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba en colaboración con la Diputación de Córdoba (2015-2016).

CURSOS RECIBIDOS:

1. Curso teórico-práctico: CYBERTRACKER. IREC, SECEM, RASTREO. EU. Ciudad Real, 18 de junio de 2016. Asistencia.
2. Jornadas de aves rapaces: Cetrería, Conservación y Sanidad. Aula AVAFES e Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba. Córdoba, 16 de Abril de 2016. Organización y asistencia.
3. Foro de fármaco-economía y especialización en novillas. Zoetis e Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba. Córdoba, 15 de Abril de 2016. Asistencia.
4. I Jornadas Cinegéticas y de Conservación de Jóvenes Cazadores Andaluces. Jóvenes Cazadores Andaluces (JOCAN). Córdoba, 9 de Marzo de 2016. Asistencia.
5. Ponencia: Actualización sobre el virus Zika y otras enfermedades emergentes. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria e Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba. Prof. Joaquín Goyache. Córdoba, 25 de Febrero de 2016. Asistencia.
6. Curso de Gestión y Conservación de Fauna Silvestre. Aula AVAFES e Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba. Córdoba, 6,7 y 8 de Noviembre de 2015. Organización y Asistencia.
7. Mesa Redonda: Actualización en la inspección veterinaria en monterías y matanzas domiciliarias. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba. Córdoba, 7 de Octubre de 2015. Asistencia.
8. IV Congreso Andaluz de Caza: Hacia un modelo de calidad cinegética. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Sevilla, 1 y 2 de Octubre de 2015. Asistencia.

ANOTACIONES: