



TESE DE DOUTORAMENTO

**Medidas de bioseguridad y su relación con
el estatus sanitario frente a enfermedades
infecciosas endémicas en granjas de vacuno
lechero**

Fco. Javier Villaamil Rodríguez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA
EN CIENCIAS VETERINARIAS



SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

ANO 2021



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

D./Dna. **Fco. Javier Villaamil Rodríguez**

Título da **Medidas de bioseguridad y su relación con el estatus sanitario frente**
tese: **a enfermedades infecciosas endémicas en granjas de vacuno lechero**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Lugo**, Seleccione a data.

Sinatura electrónica





**AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE
[Medidas de bioseguridad y su relación con el estatus sanitario
frente a enfermedades infecciosas endémicas en granjas de vacuno
lechero]**

D. Eduardo Yus Respaldiza y D. Francisco Javier Diéguez Casalta

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. **Fco. Javier Villaamil Rodríguez**, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de COMPENDIO DE PUBLICACIÓNS, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Lugo, ... de Julio de 2021



DECLARACION CONFLICTO INTERÉS

El doctorando, Fco. Javier Villaamil Rodríguez con DNI 33846350X, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral "*Medidas de bioseguridad y su relación con el estatus sanitario frente a enfermedades infecciosas endémicas en granjas de vacuno lechero*".

Relación de publicaciones que aportan contenidos a la Tesis Doctoral

- *Publicación 1:*

- Año: 2020
- Nombre y la afiliación de la autoría:
Francisco J Villaamil. Agrupación de Defensa Sanitaria (ADSG) Costa da Morte, A Coruña; estudiante de Doctorado de la USC
- Nombre y la afiliación de los coautores:
 - Ignacio Arnaiz. Servicio de Serología, Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia, Lugo.
 - Alberto Allepuz. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Miquel Molins. Servicio de Sanidad Animal, Laboratorio de Sanidad Animal de Cataluña, Lleida.
 - Mercedes Lázaro. Laboratorio Interprofesional Lácteo de Cataluña, Cabrils, Barcelona.
 - Bibiana Benavides. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.
 - Sebastián Moya. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Jordi Casal. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona; Epidemiología, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona
 - Eduardo Yus. Instituto de Investigación y Análisis de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.
 - Francisco J. Diéguez. Área de Producción animal, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.
- Referencia completa de la publicación:
Villaamil FJ, Arnaiz I, Allepuz A, Molins M, Lázaro M, Benavides B, Moya S, Casal J, Yus E, Diéguez FJ. A Survey of biosecurity measures and serological status for bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus 1 on Dairy cattle farms in north-west and north-east Spain. *Veterinary Record Open* 2020; 7:e000399.doi: 10.1136

- ISSN: 2052-6113
- Factor de impacto: 1,37
- Posición relativa en la categoría: 66/200 (Veterinary Sciences)
- Contribución del doctorado en la publicación: se incluye en la propia publicación
- Permisos: Publicada en Open Access: “This article is available under the Creative Commons CC-BY-NC license and permits non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited”
(<https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/vetreco-2020-000399>)

- *Publicación 2*

- Año: 2020.
- Nombre y la afiliación de la autoría:
Francisco J Villaamil. Agrupación de Defensa Sanitaria (ADSG) Costa da Morte, A Coruña; estudiante de Doctorado de la USC
- Nombre y la afiliación de los coautores:
 - Eduardo Yus. Instituto de Investigación y Análisis de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.
 - Bibiana Benavides. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.
 - Jordi Casal. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona; Epidemiología, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CRESA), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona
 - Sebastián Moya. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Alberto Allepuz. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Francisco J. Diéguez. Área de Producción animal, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.
- Referencia completa de la publicación:

Villaamil, F.J.; Yus, E; Benavides, B.; Casal, J.; Moya, S.J.; Allepuz, A.; Diéguez, F.J. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* introduction into dairy herds in Galicia, Northwestern Spain. *Journal of Dairy Science* 2020, 103:7411-7415.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18210>.

- ISSN: 0022-0302
- Factor de impacto: 4,034
- Posición relativa en la categoría: 6/63 (Agriculture , Dairy and Animal Science)
- Contribución del doctorado en la publicación: colección de las muestras y de los datos de bioseguridad, y revisión del artículo.
- Permisos: se incluye permiso de la revista (anexo 3).

- *Publicación 3:*

- Año: 2021
- Nombre y la afiliación de la autoría:
Francisco J Villaamil. Agrupación de Defensa Sanitaria (ADSG) Costa da Morte; estudiante de Doctorado de la USC
- Nombre y la afiliación de los coautores:
 - Eduardo Yus. Instituto de Investigación y Análisis de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.
 - Bibiana Benavides. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.
 - Alberto Allepuz. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Sebastián Moya. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
 - Jordi Casal. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona; Epidemiología, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CRESA), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona
 - Carmelo Ortega. Departamento de Anatomía, Animal Producción y Ciencias Veterinarias Clínicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

- Francisco J. Diéguez. Área de Producción animal, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

- Referencia completa de la publicación:
Villaamil, F.J.; Yus, E.; Benavides, B.; Allepuz, A.; Moya, S.J.; Casal, J.; Ortega, C.; Diéguez, F.J. Factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds in Galicia (north-west Spain): the perception of experts. *Animals* 2021, 11, 166. <https://doi.org/10.3390/ani11010166>.
- ISSN: 2076-2615
- Factor de impacto: 2,752
- Posición relativa en la categoría: 48/200 (Veterinary Sciences)
- Contribución del doctorado en la publicación: se incluye en la propia publicación
- Permisos: publicada en Open Access: “This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited”
(<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/1/166>)

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedicado a aquellos que ya no están y dejaron profunda huella en mí:

Nacho Menes, maestro y guía en mi vida.

Manolo Ramos “Zara”, por acogerme y creer en mí.

A mi madre, por serlo.

Tengo la certeza de que les hubiera encantado participar de este trabajo.

Y a los que están:

A mi compañera Adela, por tolerarme esto y mucho más (también navegar)...y ayudarme con las comas.

A mi hijo Javier que, sin saberlo, me dio la energía necesaria para emprender esta y otras muchas tareas...y por ayudarme con la informática.

A aquellos a los que quiero, Ton, Choca, Pi; sin su calor, sin su amor, yo no sería.

A Gumer de la Riera, la persona que más me enseñó sobre vacas.

Por otro lado, agradecer a “mis” ganaderos, en especial a los que colaboraron en este proyecto, su paciencia conmigo. Sin ellos esto no sería posible. Gracias por confiar en mí.

Y como no, agradecer a mis directores de tesis, Eduardo y Javier, su inestimable ayuda. De lo contrario aún estaría perdido entre datos. Gracias por vuestro apoyo.

RESUMEN

El propósito de la presente tesis fue evaluar y caracterizar la aplicación actual de medidas de bioseguridad en explotaciones de vacuno de leche en dos comunidades autónomas, Cataluña y Galicia, noreste y noroeste de España respectivamente, basándose en el estado sanitario frente a la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y la diarrea vírica bovina (BVD); como segundo objetivo, identificar posibles asociaciones entre las pautas de manejo y el estado sanitario de los rebaños lecheros en relación a la paratuberculosis en Galicia; y en tercer lugar realizar un análisis semicuantitativo de los factores de riesgo relacionados con la introducción de *Mycobacterium Avium* ssp. *Paratuberculosis* (MAP) en las explotaciones bovinas de leche gallegas basándonos en las opiniones de un grupo de expertos (veterinarios especialistas en distintas ramas del sector).

Las medidas de bioseguridad aplicadas se obtuvieron de una encuesta realizada en 31 ganaderías catalanas y 93 gallegas. La encuesta consistía en distintas preguntas sobre la granja (localización, tamaño, vacunaciones...), los movimientos de animales (compra, salida a pastos...) y la presencia de otras granjas en el vecindario, los movimientos de vehículos y equipamiento, el personal (trabajadores externos) y los visitantes (técnicos, otros ganaderos etc.). Para el caso particular de la paratuberculosis bovina, los potenciales factores de riesgo asociados con la introducción de MAP en los rebaños lecheros se seleccionaron basándose en la revisión bibliográfica. Además, para cada factor considerado en el cuestionario se desarrolló un árbol de decisión y se incluyeron preguntas clave en cada uno de ellos que los expertos debían puntuar en función del riesgo que suponía en su opinión.

En las granjas de Galicia y Cataluña, el estado sanitario frente al virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y el herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1) se determinó mediante ELISA de anticuerpos siguiendo las directrices del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de la Xunta de Galicia. Las 93 granjas encuestadas en Galicia se analizaron también frente a MAP siguiendo el programa sanitario de ADSGs: ELISA de anticuerpos y PCR en heces de animales ELISA-positivos.

En el primer estudio, los resultados se analizaron utilizando el análisis de correspondencias múltiple y un análisis de conglomerados de dos pasos. Se identificaron tres grupos de granjas: los grupos 1 y 2 incluyeron rebaños de tamaño pequeño e intermedio. Estos, en particular el grupo 1, mostraron la mayor cantidad de deficiencias en el control de vehículos y visitantes. Sin embargo, siempre se realizaron pruebas de laboratorio en los animales comprados. El grupo 3 incluía los rebaños más grandes, con un control de bioseguridad algo mejor de vehículos y visitantes. Sin embargo, las granjas de este grupo eran las que compraban más animales, a veces sin pruebas, y contrataban trabajadores externos con mayor frecuencia.

Los 93 rebaños incluidos en el segundo estudio se clasificaron como MAP positivo o MAP negativo según los resultados de laboratorio obtenidos en los 2 muestreos anuales realizados antes de completar el cuestionario. Los factores de riesgo candidatos fueron evaluados para determinar su asociación con el estado de infección por MAP. Los valores más altos se observaron para el tamaño de rebaño, los visitantes por mes que entraban en contacto con los animales, los empleados externos, los camiones que podían venir con otros animales (para sacrificio o engorde) y los vehículos de estiércol compartidos. El análisis de regresión indicó que el tamaño del rebaño y las prácticas de compra fueron los mejores predictores.

En el tercer estudio se cuantificaron las opiniones del grupo de expertos sobre los factores de riesgo implicados en la infección por MAP en rebaños de ganado lechero. Para este propósito, se eligieron los factores de riesgo potenciales asociados con la introducción de MAP en las granjas en base a una revisión de la literatura y discusiones con investigadores y veterinarios. Para cada factor, se desarrolló un árbol de decisiones y en cada uno se incluyeron preguntas clave. Las respuestas a estas preguntas llevaron a diferentes eventos dentro de cada árbol de decisiones.

Con base en los valores dados por los expertos y la información recopilada en los cuestionarios, a cada granja se le asignó una puntuación en función del riesgo de introducción de MAP. A partir de estas puntuaciones (variable de contraste) y utilizando una curva ROC, se estimó el punto de corte que mejor discriminaba las fincas MAP-positivas y negativas. Los factores de riesgo más importantes para la introducción de MAP, según opiniones de expertos, fueron las prácticas de compra y el pastoreo relacionado con animales menores de seis meses. Las puntuaciones obtenidas por cada granja permitieron discriminar las granjas MAP positivas / MAP negativas con 68,8% de sensibilidad y 68,7% de especificidad.

RESUMO

O obxectivo desta tese foi avaliar e caracterizar a aplicación actual de medidas de bioseguridade en explotacións de vacún de leite en dúas comunidades autónomas, Cataluña e Galicia, ao nordeste e ao noroeste de España respectivamente, en función do estado sanitario fronte á rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) e á diarrea vírica bovina (BVD); como segundo obxectivo, identificar as posibles asociacións entre as pautas de manexo e o estado sanitario dos rabaños de leite en relación coa paratuberculose en Galicia; e, en terceiro lugar, realizar unha análise semi-cuantitativa dos factores de risco relacionados coa introdución de *Mycobacterium Avium* ssp. *Paratuberculose* (MAP) nas explotacións galegas de bovino leiteiro a partir das opinións dun grupo de expertos (especialistas veterinarios en diferentes ramas do sector).

As medidas de bioseguridade aplicadas obtivéronse a partir dunha enquisa realizada en 31 rabaños cataláns e 93 galegos. A enquisa consistiu en diferentes preguntas sobre a granxa (localización, tamaño, vacinacións ...), os movementos de animais (compra, saír ao pasto ...) e a presenza doutras granxas na contorna, os movementos de vehículos e material, o persoal (traballadores externos) e os visitantes (técnicos, outros gandeiros, etc.). Para o caso particular da paratuberculose bovina, os factores de risco potenciais asociados á introdución de MAP en rabaños leiteiros seleccionáronse en función da revisión da literatura. Ademais, para cada factor considerado no cuestionario, desenvolveuse unha árbore de decisión incluíndose en cada unha de las preguntas clave que os expertos tiveron que puntuar segundo o risco que representaban na súa opinión.

Nas granxas de Galicia e Cataluña, o estado de saúde fronte ao virus da diarrea vírica bovina (BVDV) e o herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) determinouse mediante ELISA de anticorpos seguindo as directrices do Laboratorio de Sanidade e Produción Animal da Xunta de Galicia. As 93 explotacións enquisadas en Galicia tamén foron analizadas fronte a MAP seguindo o programa sanitario das ADSGs: ELISA de anticorpos e PCR en feces de animais ELISA positivos.

No primeiro estudo, os resultados analizáronse mediante o análise de correspondencias múltiple e unha análise de conglomerados en dous pasos. Identificáronse tres grupos de explotacións: os grupos 1 e 2 incluían rabaños de tamaño pequeno e intermedio. Estes, en particular o grupo 1, mostraron a maior cantidade de deficiencias no control de vehículos e visitantes. Non obstante, sempre se realizaron probas de laboratorio nos animais comprados. O grupo 3 incluíu os rabaños máis grandes, cun control de bioseguridade algo mellor dos vehículos e dos visitantes. Porén, foron as explotacións deste grupo as que máis animais compraron, ás veces sen probas, e contrataron a traballadores alleos con máis frecuencia.

Os 93 rabaños incluídos no segundo estudo clasificáronse como MAP positivo ou MAP negativo segundo os resultados do laboratorio obtidos nas dúas mostraxes anuais realizadas antes de completar o cuestionario. Os factores de risco candidatos

foron avaliados para determinar a súa asociación co estado de infección MAP. Os valores máis altos observáronse para o tamaño do rabaño, visitantes ao mes que entraron en contacto cos animais, empregados externos, camións que poderían vir con outros animais (para sacrificio ou engorde) e vehículos de esterco compartidos. A análise de regresión indicou que o tamaño do rabaño e as prácticas de compra foron os mellores predictores.

No terceiro estudo cuantificáronse as opinións do grupo de expertos sobre os factores de risco implicados na infección por MAP en rabaños de vacún de leite. Para este propósito, escolléronse os posibles factores de risco asociados á introdución de MAP en granxas baseándose nunha revisión da literatura e en discusións con investigadores e veterinarios. Para cada factor, desenvolveuse unha árbore de decisión e incluíronse preguntas clave en cada un. As respostas a estas preguntas levaron a diferentes eventos dentro de cada árbore de decisión.

En base aos valores dados polos expertos e á información recollida nos cuestionarios, asignóuselle unha puntuación a cada explotación en función do risco de introducción de MAP. A partir destas puntuacións (variable de contraste) e empregando unha curva ROC, estimouse o punto de corte que mellor discriminou as explotacións MAP positivas e negativas. Os factores de risco máis importantes para a introducción de MAP, segundo opinións dos expertos, foron as prácticas de compra e o pastoreo relacionado con animais menores de seis meses. As puntuacións obtidas por cada explotación permitiron discriminar as explotacións MAP positivas / MAP negativas cun 68,8% de sensibilidade e un 68,7% de especificidade.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to evaluate and characterize the current application of biosecurity measures in dairy cattle farms in two autonomous communities, Catalonia and Galicia, northeast and northwest of Spain respectively, based on the health status against infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine viral diarrhoea (BVD); as a second objective, to identify possible associations between management guidelines and the health status of dairy herds in relation to paratuberculosis in Galicia; and thirdly, perform a semi-quantitative analysis of the risk factors related to the introduction of *Mycobacterium Avium* ssp. *Paratuberculosis* (MAP) in Galician dairy farms based on the opinions of a group of experts (veterinary specialists in different branches of the sector).

The applied biosecurity measures were obtained from a survey carried out in 31 Catalan and 93 Galician herds. The survey consisted of different questions about the farm (location, size, vaccinations ...), the movements of animals (purchase, going to pasture ...) and the presence of other farms in the neighborhood, the movements of vehicles and equipment, the staff (external workers) and visitors (technicians, other farmers etc.). For the particular case of bovine paratuberculosis, the potential risk factors associated with the introduction of MAP in dairy herds were selected based on the literature review. In addition, for each factor considered in the questionnaire, a decision tree was developed, and key questions were included in each of them that the experts had to score according to the risk they posed in their opinion.

On farms in Galicia and Catalonia, the health status against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) was determined by antibody ELISA following the guidelines of the Animal Health and Production Laboratory of the Xunta de Galicia. The 93 farms surveyed in Galicia were also analyzed against MAP following the ADSSGs sanitary program: antibody ELISA and PCR of feces from ELISA-positive animal.

In the first study, the results were analyzed using a multiple correspondences analysis and a two-step cluster analysis. Three groups of farms were identified: Groups 1 and 2 included small and intermediate size herds. These, in particular group 1, showed the greatest amount of deficiencies in the control of vehicles and visitors. However, laboratory tests were always performed on the purchased animals. Group 3 included the largest herds, with somewhat better biosecurity control of vehicles and visitors. However, it was the farms in this group that bought the most animals, sometimes without testing, and hired external workers more often.

The 93 herds included in the second study were classified as MAP positive or MAP negative according to the laboratory results obtained in the 2 annual samplings carried out before completing the questionnaire. Candidate risk factors were evaluated to determine their association with MAP infection status. The highest values were observed for herd size, visitors per month who came into contact with the animals, external employees, trucks that could come with other animals (for

slaughter or fattening) and shared manure vehicles. Regression analysis indicated that herd size and purchasing practices were the best predictors.

In the third study, the opinions of the expert group on the risk factors involved in MAP infection in dairy cattle herds were quantified. For this purpose, the potential risk factors associated with the introduction of MAP on farms were chosen based on a review of the literature and discussions with researchers and veterinarians. For each factor, a decision tree was developed, and key questions were included in each one. The answers to these questions led to different events within each decision tree.

Based on the values given by the experts and the information collected in the questionnaires, each farm was assigned a score based on the risk of introducing MAP. From these scores (contrast variable) and using a ROC curve, the cut-off point that best discriminated MAP-positive and negative farms was estimated. The most important risk factors for the introduction of MAP, according to expert opinions, were purchasing practices and grazing referred to animals younger than six months. The scores obtained by each farm allowed to discriminate MAP positive / MAP negative farms with 68.8% sensitivity and 68.7% specificity.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Paratuberculosis bovina.....	15
1.1.1. Agente etiológico.....	15
1.1.2. Patogénesis, respuesta inmune y cuadro clínico.....	17
1.1.3. Epidemiología.....	19
1.1.3.1. Distribución geográfica y prevalencia.....	19
1.1.3.2. Factores de riesgo	20
1.1.3.3. Transmisión de MAP.....	21
1.1.3.3.1. Transmisión entre rebaños.....	22
1.1.4. Diagnóstico.....	23
1.1.4.1. Tests de detección de MAP	23
1.1.4.2. Tests de detección de la respuesta inmune frente a MAP	24
1.1.5. Control de MAP	25
1.1.6. Pérdidas de producción asociadas a MAP.....	28
1.1.7. Potencial zoonótico	29
1.2. Diarrea vírica bovina	30
1.2.1. Agente etiológico.....	31
1.2.2. Patogenia, respuesta inmune y cuadro clínico.....	33
1.2.2.1. Infección aguda transitoria	33
1.2.2.2. Infección fetal	34
1.2.2.3. Enfermedad de las mucosas.....	35
1.2.3. Epidemiología.....	36
1.2.3.1. Distribución geográfica y prevalencia.....	37
1.2.3.2. Factores de riesgo	38
1.2.3.3. Transmisión del BVDV	39
1.2.4. Diagnóstico.....	41
1.2.4.1. Tests de detección del BVDV	41
1.2.4.2. Tests de detección de anticuerpos frente al BVDV	43
1.2.5. Control.....	45
1.2.5.1. Vacunación	47
1.2.5.2. Medidas de bioseguridad	49
1.2.5.3. Beneficio económico de las medidas de prevención y control....	50

1.2.6. Pérdidas de producción asociadas al BVDV	51
1.3. Rinotraqueítis infecciosa bovina	52
1.3.1. Etiología	53
1.3.2. Patogenia, respuesta inmune y cuadro clínico.....	55
1.3.3. Epidemiología.....	57
1.3.3.1. Distribución geográfica y prevalencia.....	57
1.3.3.2. Factores de riesgo	58
1.3.3.3. Transmisión del BoHV-1.....	59
1.3.4. Diagnóstico	61
1.3.5. Control de la IBR.....	62
1.3.6. Pérdidas de producción asociadas al BoHV-1.....	68
1.4. Bioseguridad.....	71
1.4.1. Beneficios de las medidas de bioseguridad	73
1.4.2. Transmisión de conocimientos y opiniones sobre medidas de bioseguridad de los veterinarios.....	73
1.4.3. Opiniones sobre bioseguridad de los ganaderos.....	76
1.4.4. Implementación de un plan de bioseguridad	77
1.4.4.1. Medidas de bioseguridad	78
2. OBJETIVOS.....	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS	82
3.1. Descripción del área y rebaños encuestados	82
3.2. Cuestionario de bioseguridad y grupo de expertos.....	82
3.3. Estatus sanitario.....	86
3.4. Análisis estadístico	87
4. RESULTADOS	89
5. DISCUSIÓN.....	101
6. CONCLUSIONES.....	107
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
Anexos	157

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas tratadas en este estudio, la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), la diarrea vírica bovina (BVD) y la paratuberculosis bovina, ocasionan grandes pérdidas económicas en las ganaderías de vacuno a nivel mundial, así como trastornos tanto en la salud como en el bienestar animal, y debido a ello son objeto de control en los programas de las Agrupaciones de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSGs) de Galicia.

Las ADSGs están definidas en el artículo 2 del Real Decreto 1880/1996 como “aquellas asociaciones constituidas por ganaderos para la elevación del nivel sanitario-zootécnico de sus explotaciones mediante el establecimiento y ejecución de programas de profilaxis, lucha contra las enfermedades de los animales y mejora de sus condiciones higiénicas, que permitan mejorar el nivel productivo y sanitario de sus productos”. Por tanto, el objetivo fundamental de las ADSGs es aumentar la producción, el nivel sanitario y el bienestar de sus animales aplicando medidas de manejo y de bioseguridad y programas de control frente a diversas enfermedades que, sin ser objeto de programas nacionales de lucha y erradicación, producen graves pérdidas económicas en los rebaños. La aplicación de dichas actuaciones se traducirá en un aumento de la rentabilidad de las explotaciones.

La regulación de las ADSGs en Galicia se estableció en el Decreto 91/2001, modificado por el Decreto 245/2002. Este Decreto se desarrolló en la Orden del 2 de octubre de 2002, sustituida posteriormente por la Orden de 6 de marzo de 2007 que establece los procedimientos relativos al reconocimiento, mantenimiento y extinción de las ADSGs, así como el reconocimiento de los veterinarios responsables de las mismas.

Así, el primer programa sanitario aplicado en las ADSGs de ganado vacuno de Galicia (en el año 2003) incluía los siguientes puntos:

1. Cumplir con los programas nacionales de erradicación.
2. Control de mamitis.
3. Control parásitos internos y externos.
4. Programa de desinfección, desinsectación y desratización (DDD).
5. Control sanitario de la eliminación de cadáveres.
6. Programa de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles.
7. Programas de prevención y control frente a las enfermedades del bovino. Desde el año 2003, en Galicia, es obligatorio el desarrollo de programas sanitarios para el control frente a la IBR, la BVD y la paratuberculosis bovina que provocan

graves pérdidas económicas en el ganado gallego y que pueden suponer una traba en el libre comercio de animales y sus productos.

El programa sanitario obligatorio para el año 2010 (Orden del 6 de noviembre de 2009) establecía los siguientes puntos:

1. Cumplir el Real Decreto 784/2009 que establece las bases reguladoras de las subvenciones estatales destinadas a las ADSGs y cumplir la legislación vigente referente a la identificación animal y el registro de explotaciones.
2. Colaborar en la Red de epidemio-vigilancia de Galicia y por tanto, con los Servicios Veterinarios Oficiales (SSVVOO), con la comunicación de sospechas de alerta sanitaria y la colaboración en la recogida de muestras si fuera necesario.
3. Formación de los ganaderos con al menos 2 cursos anuales, coordinados por los veterinarios responsables de la ADSG, que englobarán, como mínimo: prevención y control de las enfermedades incluidas en los programas sanitarios, bienestar animal, enfermedades de declaración obligatoria, bioseguridad en las granjas y protocolos DDD, gestión ambiental y sostenibilidad, vigilancia pasiva de EETs
4. Todas las actuaciones de los veterinarios deben ser comunicadas a los SSVVOO, en la forma que la Administración defina.
5. Realización de una encuesta de bioseguridad, en todos los rebaños, que recogerá las características de la infraestructura sanitaria y las prácticas de manejo, con el fin de identificar los puntos críticos que puedan favorecer la entrada de enfermedades. Posteriormente los veterinarios comunicarán al ganadero, mediante un informe, las medidas correctoras a aplicar y controlarán su ejecución.
6. Colaborar en las actuaciones correspondientes a los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales (Real Decreto 2611/1996) como son la aplicación de medidas de bioseguridad en caso de sospecha o confirmación de la enfermedad, tratamiento y manejo de purines, limpieza y desinfección después de la eliminación de los animales positivos, etc.
7. Controlar y fomentar entre los ganaderos las buenas prácticas en materia de bienestar animal.
8. Programa de vigilancia y control de las EETs. Pautas de vigilancia activa, información a los ganaderos, control de los proveedores de piensos, control y asesoramiento sanitario en la eliminación de cadáveres, etc.
9. Programa DDD, con la formación de los ganaderos y la supervisión de su aplicación.

10. Programa de control de desinfección de vehículos de transporte de ganado o cualquier otro vehículo que visite la explotación.
11. Programa de control de parásitos externos e internos.
12. Programas específicos de prevención y control frente a determinadas enfermedades para conocer su nivel de prevalencia y disminuir su presencia. Para el 2010 los programas incluidos en este punto son:
 - Control de la BVD.
 - Control de la IBR.
 - Control de la paratuberculosis bovina.
 - Control de la incorporación de animales a la explotación.

En todos los programas sanitarios, las principales herramientas de trabajo son el diagnóstico de laboratorio, y la información epidemiológica y sanitaria.

El Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia (LASAPAGA), dependiente de la Consellería do Medio Rural, es el laboratorio responsable de la realización de los análisis de las muestras derivadas de la aplicación de los programas.

1.1. PARATUBERCULOSIS BOVINA

La paratuberculosis bovina, o enfermedad de Johne, es una patología crónica que afecta al ganado vacuno de leche y otros rumiantes, pudiendo producir diarrea crónica y un síndrome de malabsorción con malnutrición y debilidad muscular que origina disminución en la producción de leche, descenso de fertilidad y eliminación prematura de animales de granja (Sweeney *et al.*, 2012). Esta enfermedad limitante de la producción ha sido también implicada como posible causa potencial de la enfermedad de Crohn en humanos genéticamente susceptibles (Mishima *et al.*, 1996; Naser *et al.*, 2004; Chiodini *et al.*, 2012; Sweeney *et al.*, 2012). Por lo tanto, la prevención y control de la enfermedad a nivel de granja son importantes para asegurar rebaños productivos y sanos, así como productos lecheros seguros para las personas (Roche *et al.*, 2019).

1.1.1. Agente etiológico

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) pertenece al orden de los Actinomycetales, familia *Mycobacteriaceae*. Morfológicamente se presenta como un bacilo de 1-2 μm de longitud por 0,5 μm de ancho (Figura 1), Gram positivo facultativo, ácido-alcohol resistente, que tiende a formar colonias rugosas (Thorel *et al.*, 1990). Pertenece a las micobacterias de crecimiento lento dado su bajo ritmo metabólico y su alto tiempo de generación, que le permite subsistir en medios adversos y de escasos nutrientes ayudada por la gruesa pared celular (Juste *et al.*, 2000).

Al igual que el resto de las micobacterias, las principales propiedades estructurales y antigénicas de MAP proceden de su compleja pared celular (Grange, 1990) formada internamente por una capa de peptidoglicanos llamada mureína, responsable de dar rigidez y forma a la micobacteria. A continuación, viene una capa de arabinogalactano a la que se unen ácidos micólicos, como sulfolípidos y dimicolato de trehalosa -factor cordón-, que son los principales responsables de la ácido-alcohol resistencia y en los que se ha demostrado especificidad de especie para el hospedador (Chiodini & Van Kruiningen, 1985). La capa más externa está formada por glucolípidos llamados micósidos, específicos de especie y que le confieren la capacidad de resistir a la acción de enzimas lisosómicas (Grange, 1990).

Generalmente, presenta una tinción homogénea con el método Ziehl-Nielsen (Figura 1), aunque no es así en el caso de paredes deficientes o inexistentes (McGee *et al.*, 1971). Tal y como puede observarse en extensiones de heces y tejidos, los bacilos tienden a agruparse en grumos supuestamente debido a la disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan (Thoen & Muscoplat, 1979).

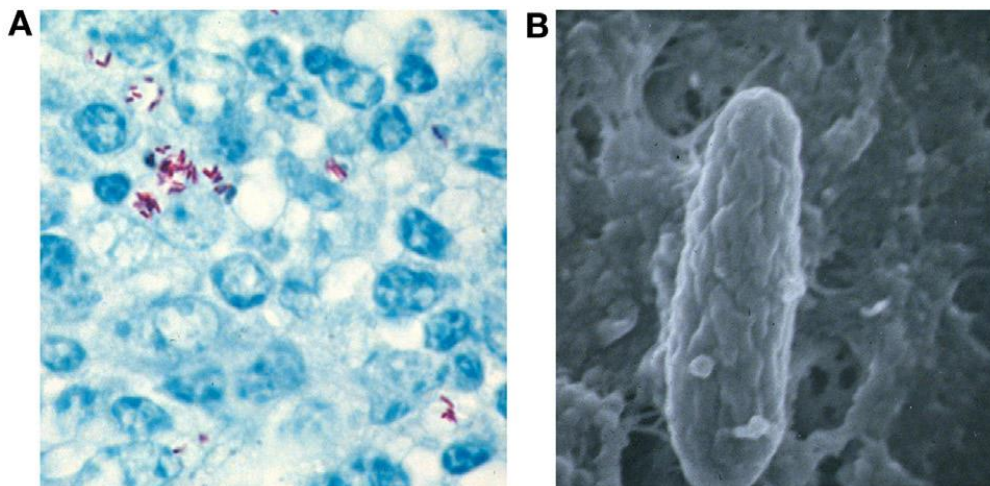


Figura 1: (A) MAP, teñido en rojo, dentro de macrófagos. (B) MAP a 50.000 aumentos (Ratnaiah et al., 2017): Open-access bajo términos Creative Commons Attribution License (CC BY)

El genoma de MAP es variable y existen heterogeneidad genética y diferencias fenotípicas entre cepas. Mediante diversas técnicas moleculares se han identificado dos grupos principales de cepas conocidas como “tipo-oveja” o “tipo S” y “tipo-vaca” o “tipo C”, según la especie hospedadora de la cual fueron aisladas por primera vez. Es importante conocer las diferencias que existen entre las cepas y cómo influyen en el desarrollo y transmisión de la enfermedad de cara a mejorar el diagnóstico y control de la misma (Stevenson, 2015).

El genotipado de MAP mediante técnicas de biología molecular puede ser usado en el estudio de las genéticas poblacionales, la patogénesis y la epidemiología molecular, incluyendo la vigilancia de la paratuberculosis y la investigación de brotes. (Fawzy *et al.*, 2018).

Por otro lado, indicar que MAP es resistente al frío, sequedad, condiciones ácidas y radiaciones ultravioleta. La pasteurización de alta temperatura y corto tiempo (al menos 71,7°C durante 15 segundos o combinación equivalente) no parece inactivar todo MAP viable (García & Shallo, 2015).

1.1.2. Patogénesis, respuesta inmune y cuadro clínico

La paratuberculosis causa una diarrea crónica caracterizada por un síndrome de malabsorción que produce malnutrición y debilidad muscular. Los animales neonatos y juveniles se infectan principalmente vía fecal-oral. La transmisión puede también ocurrir por el consumo de leche o calostro de vacas infectadas (Streeter *et al.*, 1995). Los terneros hasta los seis meses de edad son los que tienen mayor riesgo de contagiarse (Windsor & Whittington, 2010).

Modelos en ratones demuestran que, tras la ingestión, la unión y translocación de la MAP a través de la mucosa intestinal es mediada por los enterocitos y células M (Bermúdez *et al.*, 2010). Además, estudios de cultivos en tejidos demostraron que MAP afecta a la formación de uniones estrechas en la mucosa intestinal aumentando su permeabilidad (Bannantine & Bermúdez, 2013). Hay una interacción significativa entre hospedador y patógeno durante el proceso, pues el antígeno 85 (Kuo *et al.*, 2012), el antígeno 35 kDa (Bannantine *et al.*, 2003), la oxidoreductasa de MAP (Alonso-Hearn *et al.*, 2008), la proteína de unión a la fibronectina (Secott *et al.*, 2001; Secott *et al.*, 2002) y la histona HupB (Lefrancois *et al.*, 2011) juegan importantes papeles en la adhesión y/o invasión de MAP en las células epiteliales. La acidificación de los fagosomas en las células epiteliales infectadas por MAP provoca la producción de interleukina 1B, el reclutamiento de macrófagos y su migración transepitelial (Lamont *et al.*, 2012). Los bacilos son fagocitados por estos macrófagos sub- e intra-epiteliales (Momotani *et al.*, 1988; Fujimura & Owen, 1996; Lugton, 1999); una vez en el interior de las células fagocíticas, la habilidad de MAP para sobrevivir y replicarse dentro de éstas juega un papel fundamental en la patogenia (Kaufmann, 1993; Zhao *et al.*, 1997).

La terminación de la secuencia del genoma K-10 de MAP ha mejorado el entendimiento de la patogénesis y la identificación de un amplio rango de funciones de los genes involucradas en la virulencia, el metabolismo lipídico, la regulación transcriptómica y los principales patrones metabólicos (Rathnaiah, 2017).

En ganado vacuno, los tipos inmunopatológicos de paratuberculosis se han clasificado en cinco tipos en base a la caracterización histológica de las lesiones: focal, multifocal, linfocítico difuso o linfoplasmacítico, intermedio difuso y

multibacilar difuso o histiocítico. Desde una perspectiva epidemiológica se realizó la siguiente clasificación: libre de infección, Infectado (no eliminador), infeccioso (eliminador de MAP) y afectado (enfermedad clínica y eliminador de MAP) (Vázquez *et al.*, 2014). Posteriormente, ha sido propuesto reagrupar los tipos inmunopatológicos en dos amplias formas o estados epidemio-patogénicos de paratuberculosis (Vázquez *et al.*, 2014):

- Latente: infecciones con lesiones focales que constituirían un aparente estado silente, representando una dificultad para detectar reservorios de la infección, cuyo papel podría ser crítico si posteriormente los factores inmunosupresores se reactivan. La proporción de formas latentes se encuentra entre un 33,8% y 54,3% a partir de los 3 años de edad.
- Patente: casos con lesiones inflamatorias multifocales y difusas con alta viabilidad y carga micobacteriana que sugiere un riesgo epidemiológico más inmediato. Estas formas son más frecuentes durante los estadios avanzados de la enfermedad en animales adultos.

La consecuente respuesta inmune celular produce la típica enteritis granulomatosa patognomónica de la paratuberculosis (Lugton, 1999), caracterizada por el aspecto rugoso y engrosado de la pared intestinal y la inflamación de los linfonodos.

Se sabe desde hace mucho tiempo que la respuesta inmune celular mediada por Th1 tiene un papel crucial en la protección frente a la infección por MAP; sin embargo, recientes estudios sugieren que la respuesta inmune innata está más estrechamente relacionada con los efectos protectores que la inmunidad adaptativa (Park & Yoo, 2016).

En la figura 2 se muestran imágenes de lo anteriormente descrito.

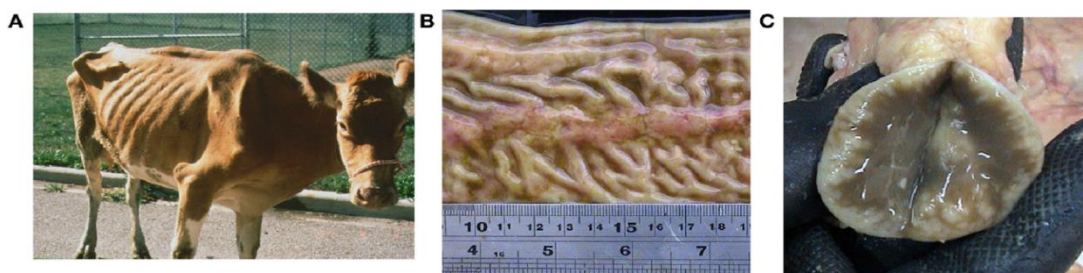


Figura 2. Enfermedad de Johne causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*:

- (A) Vaca severamente debilitada con síntomas de diarrea crónica, malabsorción, atrofia muscular y desnutrición.
- (B) La respuesta inmune celular conduce a la enteritis granulomatosa típica con engrosamiento de la mucosa intestinal y placas de Peyer prominentes.
- (C) Ganglio linfático que muestra tejido linfoide hiperactivo (manchas blancas).

(A) y (B) propias; (C) Ratnaiah *et al.*, (2017): Open-access bajo términos Creative Commons Attribution License (CC BY)

1.1.3. Epidemiología

1.1.3.1. Distribución geográfica y prevalencia

En Europa, la prevalencia de la paratuberculosis a nivel individual ronda el 20%, mientras que a nivel de rebaño supera el 50% (Nielsen, 2009).

En una encuesta realizada en 48 países de todo el mundo se encontró que la paratuberculosis era muy común en alrededor de la mitad de los países y que más del 20% de los rebaños estaban infectados (Whittington *et al.*, 2019).

El agente causal, MAP, es altamente prevalente en muchos países alrededor del mundo y acarrea grandes pérdidas económicas asociadas con la disminución de producción láctea (Fawzy *et al.*, 2018). Las poblaciones mundiales de rumiantes están infectadas con MAP y se ha encontrado que muchas especies de animales no-rumiantes son portadoras o están infectadas con ella (Waddell *et al.*, 2016).

En Europa se han llevado a cabo estudios de prevalencia, pero muy pocos proporcionan estimaciones, interpretables y comparables, de las prevalencias de MAP a nivel individual y de rebaño en animales de granja. Debido a las limitaciones de los estudios, las estimaciones de prevalencia intrarrebaño pueden ser solo establecidas aproximativamente. Así, la prevalencia individual en animales de ganado vacuno semejaba ser del 20%, 3-5% en algunos países, y la prevalencia estimada por rebaños mayor del 50% (Nielsen & Toft, 2009). En una revisión más reciente en diversos países del mundo las prevalencias en animales individuales variaban entre 0,8% y 41,4%, mientras que a nivel de rebaño estaba entre 7% y 83,3%. Estas grandes variaciones se deben al tipo de aptitud de los rebaños estudiados, al número de rebaños analizados y a los métodos de diagnóstico utilizados, así como al año y al país de realización del estudio (García & Shallo, 2015).

La prevalencia media estimada en distintos estudios es generalmente menor del 15% (Verdugo *et al.*, 2015; McAloon *et al.*, 2016b). Señalar, sin embargo, que estas estimaciones derivan de análisis Bayesianos de tipo latente que son por sí mismos problemáticos cuando se aplican a la paratuberculosis (McAloon *et al.*, 2019).

En un estudio de seroprevalencias frente a MAP en ganado vacuno en Galicia (noroeste de España) se comprobó una prevalencia verdadera baja a nivel individual (3% vacas lecheras, 1% vacas de carne y 2,8% vacas en granjas de aptitud mixta) y un mayor porcentaje de rebaños bovinos lecheros en comparación con los de aptitud cárnica o mixta (Diéguez *et al.*, 2007).

La aparente falta de prevalencias válidas en la mayoría de los estudios de Europa sugeriría que algunas decisiones deberían ser revisadas si desean comparar su situación con la de otros países. Dichos estudios deberían ser diseñados para apuntar a las poblaciones objetivo y los resultados deberían ser interpretados con métodos

apropiados, idealmente incluyendo evaluaciones de los tests usados con la definición del caso en mente. Los informes rigurosos también son importantes. Los requisitos mínimos en la comunicación de los estudios de prevalencia son: a) las poblaciones objeto del estudio, incluyendo la edad de distribución; b) los tests usados, incluyendo precisión, protocolo, etc.; c) período de estudio; y d) diferenciar las prevalencias aparentes y/o reales para cada especie animal (Nielsen & Toft, 2009).

1.1.3.2. Factores de riesgo

La susceptibilidad a la paratuberculosis es dependiente de la edad y determina la base de los programas de control en granja. Un metaanálisis concluyó que había una considerable diferencia entre la susceptibilidad de los adultos y la de los terneros menores de 6 meses y entre los adultos y los animales de entre 6 y 12 meses de edad (Windsor & Whittington, 2010). En un estudio reciente de infección experimental en terneros, estos podían ser infectados con altas o bajas dosis de MAP hasta los doce meses de edad (Mortier *et al.*, 2013); sin embargo, la dosis más baja utilizada en este estudio, 5×10^7 unidades formadoras de colonias UFC, administrada dos días consecutivos, fue más alta que la dosis mínima, 1.5×10^6 UFC, utilizada en otros estudios (Sweeney *et al.*, 2006). No obstante, esta observación puede tener considerables consecuencias para los programas de control: un reciente estudio francés de modelización advierte que el ritmo de descenso en la susceptibilidad a la infección con la edad tiene un evidente efecto en la transmisión intrarebaño (Ben Romdhane *et al.*, 2017).

El tamaño del rebaño ha sido identificado como un factor de riesgo para la positividad (Vilar *et al.*, 2015; García & Shallo, 2015; Donat *et al.* 2016; McAloon *et al.*, 2017a). Este descubrimiento no es único de la paratuberculosis y es interesante dado que el incremento del tamaño del rebaño es una tendencia global en las ganaderías lecheras (Barkema *et al.*, 2015). Las razones de esta observación no están claras. En algunos casos, los rebaños grandes pueden ser fruto de la fusión de rebaños más pequeños, y por tanto el efecto del tamaño en la prevalencia de MAP es confundido con el comportamiento de compra. Además, los rebaños de mayor tamaño pueden facilitar el contacto entre animales y llevar asociadas prácticas de manejo que facilitan el establecimiento de la infección una vez la MAP ha sido introducida (McAloon *et al.*, 2019).

Otra explicación, en estudios serológicos, puede estar relacionada con la defectuosa especificidad de los tests de diagnóstico. Los valores del punto de corte de los animales reaccionantes se usan para tratar de contrarrestar la falta de especificidad (por ejemplo, considerar el rebaño positivo basándose en dos animales reaccionantes mejor que en uno solo); sin embargo, a medida que el tamaño del rebaño aumenta, la probabilidad de observar dos o más falsos positivos también aumenta, independientemente del estatus del rebaño (McAloon *et al.*, 2019).

Por otro lado, MAP puede sobrevivir y replicarse en amebas de vida libre en ambientes acuáticos y podrían volverse más resistentes al efecto de la clorina; además, parásitos como los nemátodos pueden también actuar como vectores en la transmisión de MAP (García & Shallo, 2015).

Las siguientes prácticas de manejo constituyen los principales factores de riesgo para la transmisión de MAP: la utilización de calostro de vacas con un diagnóstico previo positivo a paratuberculosis y que las terneras de reposición menores de 6 meses se alojen con las vacas adultas (Diéguez *et al.*, 2008).

El riesgo de seroconversión frente a MAP fue 2 veces más alto entre las terneras nacidas de vacas seropositivas y eliminadoras fecales, y entre 1,5-1,6 veces si lo son de hembras únicamente seropositivas (Mato *et al.*, 2017b).

Otras prácticas de manejo que presentan un alto riesgo para la transmisión de la paratuberculosis fueron el uso de las áreas de parto para más de un parto simultáneamente, la no limpieza de estas entre partos, el uso del área de partos para el aislamiento de vacas enfermas, la utilización de mezclas de calostro o leche de varias vacas y leche de desecho para los terneros, y la despoblación de rebaños después de la eliminación de animales por control de enfermedades (García & Shallo, 2015; Kennedy *et al.*, 2014).

1.1.3.3. Transmisión de MAP

La principal vía de adquisición de la enfermedad es la oral, al ser ingerida la micobacteria por animales susceptibles con el agua, alimento o superficies contaminadas a las que puedan tener acceso (Gerlach, 2002); no obstante, MAP puede introducirse en el organismo del hospedador bovino por diferentes rutas de transmisión (Barkema *et al.*, 2017):

- Ingestión de material fecal: el hecho de que MAP pueda sobrevivir en las heces hasta 55 semanas, en ambientes húmedos por encima de las 48 semanas y en el suelo hasta 47 meses, apoya el riesgo asociado con el estiércol (García & Shallo, 2015).
- La excreción en heces se considera habitualmente moderada en vacas con enfermedad subclínica, por debajo de 10^3 UFC/gr, aunque en algunos casos pueden encontrarse animales que aun estando en esta fase de la enfermedad actúan como grandes excretores (Whitlock *et al.*, 2006). El riesgo de infección es mucho más elevado cuando aparece un animal clínicamente enfermo pues la eliminación de bacilos es mucho mayor (Chiodini *et al.*, 1984a).
- Beber calostro o leche contaminada. Los animales lactantes pueden infectarse al mamar directamente de ubres contaminadas con materia fecal, además de por el calostro o la leche; debido a la mayor susceptibilidad de estos animales solo es necesaria una pequeña dosis para ser infectados (Diéguez, 2007). Investigando la

eliminación de micobacterias en vacas clínicamente sanas, pero positivas a cultivo fecal, se encontró que el 22,2% excretaban MAP en el calostro y un 8,3% también lo hacían en la leche, observándose una relación directa entre la cantidad de micobacterias encontradas en heces y la detección en calostro y leche (Streeter *et al.*, 1995). Un estudio sobre la excreción de MAP en leche de vacas positivas a la prueba de ELISA ha estimado una media de 42,3 UFC por cada 100 ml de leche (Herman *et al.*, 2006).

- La transmisión ternero-ternero ocurre, y el contacto con animales infectados incrementa la probabilidad de que los terneros sean infectados con MAP; no obstante, para obtener datos definitivos son necesarios estudios longitudinales que cuantifiquen el riesgo de transmisión de MAP entre terneros mediante la medición de la eliminación de MAP, la contaminación ambiental y los niveles en tejidos de terneros infectados de forma natural (Barkema *et al.*, 2018).
- Infección intrauterina. La transmisión intrauterina ha sido suficientemente documentada y demostrada, ya que se ha aislado MAP de tejidos fetales y maternos, aunque esta vía parece limitarse, en su mayoría, a madres clínicamente enfermas (Lamberte *et al.*, 2004).
- Un estudio retrospectivo de Aly y Thurmond en 2005 demostró que la probabilidad de que un animal sea seropositivo es 6,6 veces mayor para las hijas de vacas seropositivas que para las de vacas seronegativas, ya sea por transmisión congénita o vía calostro/leche, aunque la principal vía de transmisión se considera siempre la fecal-oral (Clarke, 1997).
- Transmisión ambiental: MAP ha sido aislada a partir de muestras de polvo en suspensión, tomadas en granjas que alojan animales infectados lo que podría sugerir la posibilidad de transmisión mediante aerosoles (Eisenberg, 2010). La supervivencia de MAP en el ambiente parece depender de varios factores, incluyendo el pH del suelo, contenido fecal, concentraciones de macro- y micronutrientes (ej., hierro y cobre), temperatura y exposición a luz solar (Barkema *et al.*, 2018). Son necesarios más estudios para investigar el papel de la transmisión ambiental teniendo en cuenta las características de supervivencia de MAP y la estructura de contacto entre animales en un rebaño.

1.1.3.3.1. Transmisión entre rebaños

La introducción de MAP en los rebaños ocurre más frecuentemente después de la incorporación de nuevos animales al rebaño. Una reciente revisión sistemática sobre los factores de riesgo asociados con la introducción de MAP en rebaños de vacuno lechero informó de una asociación positiva entre la compra de animales y la positividad del rebaño en 6 de cada 14 estudios revisados (Rangel *et al.*, 2015). En estudios publicados posteriormente a este, 3 de cada 6 demostraron asociación positiva con la incorporación de animales (Künzler *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2016; Puerto-Parada *et al.*, 2018) mientras otros tres no encontraron tal efecto (Vilar *et al.*,

2015; Donat *et al.*, 2016; McAloon *et al.*, 2017a). Estudios demostrativos revelaron que varios factores, además de la compra de nuevos animales, regulan el riesgo de que una infección persista o desaparezca cuando un animal infectado ha sido introducido. En un estudio piloto se predijo la desaparición de la infección después de la incorporación de un único animal infectado en el 66% de los casos (Marcé *et al.*, 2011).

Aunque el testaje de animales previo a la compra previene la introducción de animales positivos, el largo período de incubación podría resultar en animales falsos-negativos. Por ello, el testaje a nivel de rebaño en el rebaño de origen, en un programa de vigilancia y certificación, es probablemente más eficaz en reducir el riesgo asociado con el comercio de animales entre rebaños (Barkema *et al.*, 2018).

MAP se ha aislado en diferentes especies de animales salvajes, rumiantes y no rumiantes (Godfroid *et al.*, 2000; Kopecna *et al.*, 2008; Nugent *et al.*, 2011; Rangel *et al.*, 2015) y en cabras y ovejas (Behr *et al.*, 2010), que pueden compartir pastos con vacas infectadas (Barrett *et al.*, 2011). En un estudio, la cepa aislada en los animales silvestres fue la misma que en el ganado doméstico (Stevenson *et al.*, 2009), lo que hace pensar en el posible rol de la fauna silvestre en la epidemiología y transmisión de MAP al ganado vacuno (Rangel *et al.*, 2015). No obstante, en diversos estudios, la prevalencia media de MAP notificada en fauna silvestre fue de 2,4%, por lo que pueden existir reservorios de MAP localmente pero su importancia para el control de la paratuberculosis en explotaciones ganaderas es bastante limitada (Carta *et al.*, 2013).

Las prácticas de manejo con el objetivo de prevenir la introducción de nuevos animales infectados en el rebaño y la reducción del contacto entre los terneros recién nacidos y los animales adultos y sus heces, son elementos clave para minimizar la introducción y la transmisión dentro de un rebaño (Puerto-Parada *et al.*, 2018).

1.1.4. Diagnóstico

1.1.4.1. Tests de detección de MAP

La detección de animales infectados en fase subclínica de forma precoz permitiría minimizar las pérdidas y evitar que los animales permanezcan en el rebaño desarrollando la enfermedad y excretando micobacterias (González *et al.*, 2004).

Cuando la infección se detecta en la fase clínica la enfermedad ya se ha extendido a otros animales. Se estima que por cada caso clínico hay entre 5 y 25 excretores subclínicos (Whitlock & Buergelt, 1996; Magombedze *et al.*, 2013).

El diagnóstico en animales vivos se basa en la detección directa de MAP, generalmente en heces, o por valoración indirecta de la respuesta del hospedador. Las técnicas más frecuentemente usadas para la detección directa de MAP son el diagnóstico molecular (PCR), la microscopía y el cultivo (Chaubey *et al.*, 2016). El cultivo se considera el “gold standard” (prueba de referencia) e identifica el estado

de la enfermedad cuantificando la carga bacteriana en heces ya que esta aumenta durante el curso de la infección. Sin embargo, MAP crece muy lentamente “in vitro” y por lo tanto la infección solo puede ser descartada después de meses (NRC, 2003). Aunque el cultivo tiene una alta especificidad, la sensibilidad es baja en las fases subclínicas debido a la excreción intermitente y a la baja carga bacteriana (Nielsen & Toft, 2008). Los PCRs fecales son más rápidos que el cultivo, pero susceptibles a contaminantes inhibitorios lo cual reduce la sensibilidad de la prueba (Wells *et al.*, 2006). Recientemente la fiabilidad de los tests PCR ha sido mejorada pero su sensibilidad no supera a la del cultivo (Plain *et al.*, 2014).

Una combinación de ELISA de anticuerpos y cultivo fecal en terneras/os mayores de un año, junto al testaje de animales mayores de 36 meses cuando se realiza un cribado en el rebaño, podría mejorar la detección de animales infectados con MAP (Mortier *et al.*, 2015).

Dadas las limitaciones de los actuales métodos de diagnóstico hay una considerable investigación para la consecución de pruebas diagnósticas de MAP: análisis de bacteriófagos, nuevos antígenos específicos de MAP, detección de proteínas del hospedador, análisis transcriptómicos, micro ARN, análisis del microbioma (Britton *et al.*, 2016; Chaubey *et al.*, 2016). El análisis de transcriptomas bacterianos puede llevar a la identificación de antígenos novedosos y también de especies de ARN circulante por lo que son objetivos prometedores (Van den Esker & Koets, 2019).

1.1.4.2. Tests de detección de respuesta inmune frente a MAP

La detección de la respuesta del hospedador se basa en la observación de síntomas clínicos combinado con tests inmunológicos que incluyen la medición de la producción de anticuerpos y el test de reacción retardada de detección de interferón gamma. La aplicación de tests ELISA solo se recomienda para animales en fase avanzada de la enfermedad puesto que la reacción humoral ocurre relativamente tarde en la infección. La especificidad de esta prueba es alta, mientras la sensibilidad es limitada (Nielsen & Toft, 2008).

La prueba del interferón gamma es utilizada para la detección de la exposición a MAP y de la infección en los estados iniciales. Esta prueba detecta la respuesta celular después de la estimulación por antígenos específicos (Jungersen *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en 2006 en el que se evaluaron cuatro ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos frente a MAP se observó que ninguno de los tests fue efectivo para la detección precoz de infecciones por MAP en vacas lecheras. (Diéguez *et al.*, 2009).

Aunque los niveles de anticuerpos frente a MAP en leche de tanque estaban relativamente bien correlacionados con la seroprevalencia intrarebaño, la utilidad

práctica del testaje de la leche de tanque para MAP es limitado, especialmente en relación con la especificidad (70,5-53%) (Pesqueira *et al.*, 2017).

1.1.5. Control de MAP

El control de la paratuberculosis puede mejorar la sanidad y el bienestar animal, incrementando la productividad, reduciendo problemas potenciales e incrementando la rentabilidad global de la empresa ganadera. Todos estos beneficios deben ser comunicados a todas las partes interesadas de la industria para promover la implementación de programas de control (García & Shallo, 2015). Las recomendaciones relacionadas con la forma de comunicarse con los ganaderos y la motivación de los diversos grupos de ganaderos de acuerdo con las percepciones específicas serán esenciales para optimizar las medidas de prevención y control, y, por tanto, para incrementar el éxito de los programas voluntarios de control (Ritter *et al.*, 2016).

El control de la paratuberculosis es un reto y aunque la erradicación se ha comunicado en rebaños de cabras (Gavin *et al.*, 2018), no hay informes publicados de su erradicación en rebaños de vacuno infectados (Barkema *et al.*, 2018). Las opciones de control de la paratuberculosis en los rebaños infectados fueron necesariamente establecidas en función de la probabilidad biológica basada en las vías de excreción conocidas y en la susceptibilidad por la edad. Debido a los largos períodos de incubación de la enfermedad y a la baja sensibilidad de los tests de diagnóstico, la eficacia de las pruebas de control en el campo es insuficiente (McAloon *et al.*, 2019b). En nueve rebaños de EE. UU. se demostró una disminución de la prevalencia después de un tiempo tras la aplicación de siete medidas de control: 1) aislamiento de partos; 2) separación del ternero en las primeras dos horas; 3) selección y recogida higiénica del calostro; 4) alimentación con leche pasteurizada o sustitutivo lácteo; 5) separación del rebaño adulto; 6) eliminación de positivos fuertes a ELISA; 7) selección de novillas para reposición hijas de vacas ELISA negativas (Collins *et al.*, 2010). En otros casos, la disminución de la prevalencia en el tiempo se demostró en rebaños inscritos en programas nacionales de control. Una reducción en la detección de nuevos animales excretores, en un período de 6 años, se demostró en 25 rebaños lecheros de Alemania (Donat *et al.*, 2016). En Minnesota, en seis rebaños, los terneros nacidos después de 12 meses de la iniciación de un programa de control tenían menos riesgo de contraer la infección que aquellos nacidos de 12 a 24 meses antes de la instauración de dicho programa (Ferrouillet *et al.*, 2009).

Para estudiar el impacto de las medidas de control de una manera más económica, distintos investigadores han desarrollado modelos de transmisión de las enfermedades infecciosas que permiten a los investigadores estudiar los efectos de las medidas aisladamente (Marcé *et al.*, 2010).

Debido a las pérdidas económicas y a la posible asociación con la enfermedad de Crohn, se han desarrollado muchos programas de control en todo el mundo. Muchos

de estos programas se centraban en rebaños infectados con MAP y se basaban en la realización de tests y la posterior eliminación de los animales positivos, además de adaptaciones de manejo (Benedictus, 1984; Collins, 1994; Rossiter & Burhans, 1996; Kennedy, 2001). Otros programas se centraban en identificar rebaños MAP-negativos con el objetivo de mantenerlos negativos, y en el caso de Australia, Noruega y Suecia una región entera negativa, que además servían para abastecer de ganado de reposición negativo (Kalis *et al.*, 2004; Kennedy, 2011; Frössling *et al.*, 2013; Whist *et al.*, 2014). Los tests incluían aquellos de hipersensibilidad retardada en piel, tests serológicos, detección directa de MAP por microscopía y mediante cultivo o reacción en cadena de la polimerasa, PCR, para detectar MAP en heces. Actualmente el cultivo en heces se considera la prueba más sensible y específica ante-mortem para identificar infecciones por MAP (Whitlock *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2002). Sin embargo, como el cultivo fecal es caro y se prolonga en el tiempo, la mayoría de los programas usan el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA, para detectar animales potencialmente infectados (Lavers *et al.*, 2014). Otra razón para usar ELISAs es que la magnitud de la excreción se correlaciona bien con los títulos del ELISA (Dagartz *et al.*, 2001) y por lo tanto la eliminación de positivos a ELISA puede ser una opción efectiva y relativamente barata de eliminar grandes excretores. Actualmente el cultivo fecal es a menudo sustituido por la PCR en heces (Plain *et al.*, 2014; Laurin *et al.*, 2015).

En general, los programas de control incluyen los siguientes objetivos (Geraghty *et al.*, 2014):

- Mejorar la seguridad alimentaria y proteger áreas/rebaños libres como Australia y Holanda.
- Demostrar y proteger la ausencia de enfermedad a nivel nacional, regional o de rebaño como en Noruega (Whist *et al.*, 2014), Suecia (Frössling *et al.*, 2013), y norte y oeste de Australia (Kennedy 2011).
- Proteger la exportación de leche y productos genéticos como Canadá (Mckena *et al.*, 2016).
- Disminuir la prevalencia de la infección por MAP y limitar las pérdidas económicas a nivel de granja como Dinamarca (Nielsen *et al.*, 2007), Gran Bretaña (Pritchard *et al.*, 2017), Irlanda (McAloon *et al.*, 2016) y EE. UU. (Wells *et al.*, 2008), Canadá y Holanda.
- Proporcionar acreditación de rebaños de bajo riesgo como Canadá, Dinamarca, Holanda y Gran Bretaña.
- Reducir el impacto negativo de la infección sobre el bienestar animal y/o social, legal y financiero como Australia, Canadá, Holanda, Gran Bretaña y EE. UU.

La erradicación es un objetivo a largo plazo en Dinamarca y Holanda (Geraghty *et al.*, 2014).

La clasificación de rebaños en base a la prevalencia intrarebaño facilita el control coordinado regionalmente mediante el seguimiento del comercio basado en el riesgo y proporciona el reconocimiento de progresos en granja individual y a nivel regional; este sistema está siendo aplicado en Australia, Dinamarca, Holanda y Gran Bretaña (Geraghty *et al.*, 2014).

Medidas de bioexclusión enfocadas en la introducción de animales de reposición, como restricciones oficiales al comercio en rebaños infectados, se han implementado en Australia, Holanda, Gran Bretaña, Dinamarca y EE. UU., además de medidas de biocontención, como prácticas de cría de terneras para minimizar el riesgo e identificación y eliminación preferencial de animales de alto riesgo de estar infectados (Geraghty *et al.*, 2014).

Algunos factores que dificultaron el éxito de estos programas fueron la falta de cumplimiento de los protocolos de manejo, el uso de tests con insuficiente sensibilidad para detectar animales infectados, la persistencia de MAP en el medio ambiente, la inadecuada frecuencia en la realización de tests, la aparición de nuevas infecciones inesperadas y la compra de animales de reposición que provocaron nuevas introducciones (Benedictus, 1984; Collins, 2001). En un estudio alternativo se demostró que la constancia en la aplicación de medidas preventivas era fundamental para el éxito, aunque solamente testar y eliminar no era definitivo para controlar la paratuberculosis (Groenendaal *et al.*, 2003). Sin embargo, testar y eliminar puede permitir y acelerar la eliminación de la infección de un rebaño que a la vez aplique buenas medidas de manejo (Kudahl *et al.*, 2011). Debido a que no hay cura, ni tampoco vacunas que prevengan eficazmente la infección por MAP, excepto para las ovejas, el control de la paratuberculosis se basa primordialmente en las estrategias de manejo que reduzcan el riesgo de infección en los terneros jóvenes y limitar la transmisión dentro del rebaño y entre rebaños (Barkema *et al.*, 2018). Además, los programas que incluyen tests individuales de los animales, generalmente recomiendan la eliminación de los animales positivos a MAP. Aunque los programas de control de paratuberculosis se han implementado en los países más desarrollados, las lecciones aprendidas con la experiencia de los programas de prevención y control son poco citadas a nivel mundial. Los programas de control de la paratuberculosis son típicamente evaluados en un pequeño número de rebaños (Collins *et al.*, 2010; Pillars *et al.*, 2011) y muchos programas de control no han incluido al ganado de aptitud cárnica. Además, particularmente en vacuno, los resultados de un programa de control solo pueden ser evaluados después de al menos 5 años (Caldow & Gunn, 2001; Nielsen & Toft, 2011), aunque la mayoría de los programas bien diseñados han sido implementados durante ese tiempo. Excepto para las cabras en Noruega (Nagel-Alne *et al.*, 2014) no se encontró ningún informe sobre la erradicación con éxito de la infección con MAP en ningún rebaño (Barkema *et al.*, 2018).

La vacunación es el método más eficiente y coste-efectivo para la prevención de la aparición de casos clínicos en los rebaños. Las principales razones para no usar vacunas son probablemente debidas a la interferencia con las pruebas serológicas de

diagnóstico para la tuberculosis bovina (Coad *et al.*, 2013; Serrano *et al.*, 2017). El control de la paratuberculosis usando la vacunación, testaje y eliminación o combinaciones de ambos, resultó económica y ha sido usada como herramienta para ayudar en los programas de control de Australia, Nueva Zelanda, Holanda, Canadá, Islandia e India (Bastida & Juste, 2011; Singh *et al.*, 2015; Shephard *et al.*, 2016; Whittington *et al.*, 2019). Sin embargo, la vacunación ha sido prohibida en Dinamarca, Noruega y Suecia, y la eliminación ha sido utilizada como método de control en su lugar. Como ejemplo Australia, en donde usando vacuna disminuyó la infección de >35% a <1% (Hore *et al.*, 1971; Dhand *et al.*, 2016; Whittington *et al.*, 2019). El control mediante la vacunación produjo pérdidas mínimas a largo plazo resultando coste-efectivo en un horizonte vista de 10 años (Lamont *et al.*, 2014). En la India, la vacunación usando cepas locales administradas a los animales domésticos mejoró la productividad individual y ayudó a conservar las razas nativas de animales domésticos amenazadas, especialmente las razas lecheras, debido a las condiciones de la paratuberculosis (Singh *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2019).

1.1.6. Pérdidas de producción asociadas a MAP

La paratuberculosis es un importante problema de salud que produce diarrea intermitente, pérdida de condición corporal y disminución de la productividad (Tiwari *et al.*, 2006; Pesqueira, 2017). El agente causal de la enfermedad de Johne en rumiantes acarrea severas pérdidas a nivel mundial (Van den Esker *et al.*, 2019). Además, la alta endemicidad de la enfermedad en los rebaños afecta adversamente a las razas de alta producción reduciendo la vida productiva de las mismas, así como su producción individual (Gupta *et al.*, 2019).

Los rumiantes infectados excretan MAP en las heces y en la leche en cantidades crecientes a medida que progresa la enfermedad (Whitlock & Buergelt, 1996; Pesqueira, 2017).

La seropositividad a MAP estuvo relacionada con elevado recuento de células somáticas en la leche de tanque e incremento de la incidencia de mamitis clínicas (Diéguez *et al.*, 2008).

Aunque no se observó un efecto significativo entre el serostatus frente a MAP y los parámetros de calidad de la leche de cada vaca (Pesqueira *et al.*, 2015), las vacas seropositivas a MAP son más probablemente eliminadas de la granja debido a muerte, sacrificio urgente, baja productividad, infertilidad u otras causas (Mato *et al.*, 2015). Además, la probabilidad de dificultades en el parto fue casi 3 veces más elevada y el intervalo parto-primera inseminación se incrementó una media de 14 días en las vacas seropositivas (Mato *et al.*, 2015; Pesqueira *et al.*, 2015).

Las vacas seropositivas a MAP presentaban un peso medio de la canal 58,45 Kg. más bajo, peor puntuación de conformación de la canal y capas de grasa más delgadas que las vacas seronegativas (Mato *et al.*, 2017a). En la fase terminal, a la que muchos

animales no llegan por ser eliminados antes, los animales mueren con una condición corporal muy pobre.

La enfermedad está ampliamente difundida entre los rumiantes, tanto domésticos como salvajes y en casi todos los países del mundo, causando grandes pérdidas económicas, no solo por la merma en la productividad sino también como resultado de la pérdida de la futura progenie debido al descarte prematuro (Mckena *et al.*, 2006; García & Shalloo, 2015).

Una reducción en la producción, corregida para el número de lactación y rebaño de origen, de 1,87 kg/día, equivalente al 5,9% de la producción, fue asociado con cultivo o PCR positivos en animales individuales (McAloon *et al.*, 2015).

En una revisión en 2015, García y Shalloo informaron de pérdidas substanciales debido a la infección por MAP, las cuales aumentan a medida que lo hace la prevalencia y la incidencia de la enfermedad clínica dentro del rebaño. En Canadá el daño económico causado por la enfermedad se estimó en 50 dólares canadienses, unos 32 €, por vaca y año en los rebaños infectados, resultando una media de cerca de 3000 dólares canadienses anuales por rebaño (Chi *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2008). Raizman *et al.*, (2009), estimaron pérdidas por sobrealimentación de 366 dólares canadienses por vaca excretora y lactación, mientras que Bhattarai *et al.* en 2014 calcularon una pérdida de 1644 dólares EE. UU. por cada 100 vacas para una prevalencia del 7%. El coste de la enfermedad en EE. UU. en la industria del ganado vacuno se estimó en 250 millones de dólares por año (Ott *et al.*, 1999).

1.1.7. Potencial zoonótico

En relación a la importancia de la paratuberculosis como enfermedad del ganado lechero, el efecto más significativo tal vez sea la potencial relación con la enfermedad de Crohn en humanos (McAloon, *et al.*, 2019).

Las personas que padecen la enfermedad de Crohn (CD) son un grupo heterogéneo y la etiología puede no ser la misma para todos los individuos, existiendo tres teorías sobre su etiología, e incluso combinación de varias de ellas: la autoinmunitaria, la inmunodeficitaria y la micobacteriana (Pesqueira, 2017). MAP se encuentra entre el listado de agentes patógenos que han sido asociados con la CD. Siguiendo la colonización del hospedador, MAP evade el sistema inmune del hospedador mediante mimetismo molecular, exhibiendo secuencias de péptidos similares a aquellas de las células del hospedador causando una interrupción de las auto-versiones no auto-reconocidas; el fallo para reconocer a MAP como distinto de las células del hospedador podría resultar en diversas condiciones autoinmunes (Garvey, 2018).

MAP ha sido también postulado de estar implicado en el progreso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y otras enfermedades de disfunción inmune: la esclerosis múltiple, la sarcoidosis, la diabetes mellitus tipo 1 y 2, la

tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Parkinson (Waddell *et al.*, 2015; Rathnaiah *et al.*, 2017; Garvey, 2018).

Los humanos son expuestos a MAP por distintas fuentes que pueden estar contaminadas con heces de animales infectados como son el agua de bebida, la leche, los quesos, la carne cruda, etc. (Waddell *et al.*, 2016; Garvey, 2018); sin embargo, aún existe bastante desconocimiento de la información cuantitativa sobre la prevalencia y concentración de MAP en fuentes contaminadas, la cual es esencial para entender el riesgo de exposición, las oportunidades de intervención para mitigar el riesgo y valorar la importancia de diversas fuentes de exposición de humanos a MAP, incluyendo el contacto directo con animales y ambiente, así como el consumo de alimentos y agua contaminada (Waddell *et al.*, 2016). La aplicación de la pasteurización estándar destruye a MAP, sin embargo, algunas bacterias sobreviven al tratamiento térmico de la subpasteurización a bajas temperaturas usado para la fabricación de quesos (Rathnaiah *et al.*, 2017).

Actualmente se usa la combinación de fármacos antiinflamatorios, antimicobacterianos e inmunosupresores para el tratamiento de la enfermedad. Estudios *in vitro* utilizando la combinación de antimicrobianos e inmunomoduladores muestran un efecto sinérgico que podría ser aplicado al tratamiento de la CD (Rathnaiah *et al.*, 2017). Son necesarios más estudios para encontrar nuevos fármacos que mejoren las terapias frente a MAP y así poder acortar y simplificar tratamientos.

La potencial relación entre la paratuberculosis en rumiantes y la CD en humanos necesita ser clarificada pues no existe consenso sobre el riesgo zoonótico de MAP en el contexto de las enfermedades de humanos.

1.2. DIARREA VÍRICA BOVINA

La BVD es una de las enfermedades infecciosas más severas del ganado vacuno ocasionando serias pérdidas económicas a la industria (Gunn *et al.*, 2004). El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) ocasiona toda una serie de manifestaciones clínicas. Los síndromes reproductivos son particularmente perjudiciales, resultando pérdidas económicas significativas debidas a abortos y mortalidad perinatal en los animales infectados. Un aspecto serio del síndrome reproductivo es el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI). Los animales PI son el principal reservorio del virus y la principal fuente de transmisión del BVDV. Además, pueden desarrollar la fatal enfermedad de las mucosas (MD) (Bianchi *et al.*, 2017). El BVDV también puede producir enteritis durante la enfermedad aguda o transitoria que, aunque generalmente no es severa, puede ocasionalmente ser fatal incluso en animales adultos. La infección transitoria (TI) puede causar inmunosupresión y es probable que contribuya al desarrollo del síndrome respiratorio bovino (SRB) (OIE, 2017).

1.2.1. Agente etiológico

El BVDV es un importante agente infeccioso que afecta a la productividad y reproducción del rebaño ocasionando importantes pérdidas económicas (Larghi, 2018). Presenta distribución mundial y afecta al ganado vacuno de todas las razas y edades (OIE, 2017). Pertenece al género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* (Simmonds *et al.*, 2011).

El BVDV es un virus con RNA monocatenario que codifica para 4 proteínas estructurales, 3 localizadas en la envoltura lipídica y otra en la nucleocápside icosaédrica, y 7 proteínas no estructurales (Figura 3). Dentro de las proteínas no estructurales la más estudiada es la denominada NS3 (p80), ya que es inmunogénica y los anticuerpos que se generan frente a ella son la base de diversos ELISAs comerciales para detectar anticuerpos frente al BVDV (Arnaiz *et al.*, 2015). En la figura 3 se representan la estructura del virus y las regiones que codifican para cada proteína.

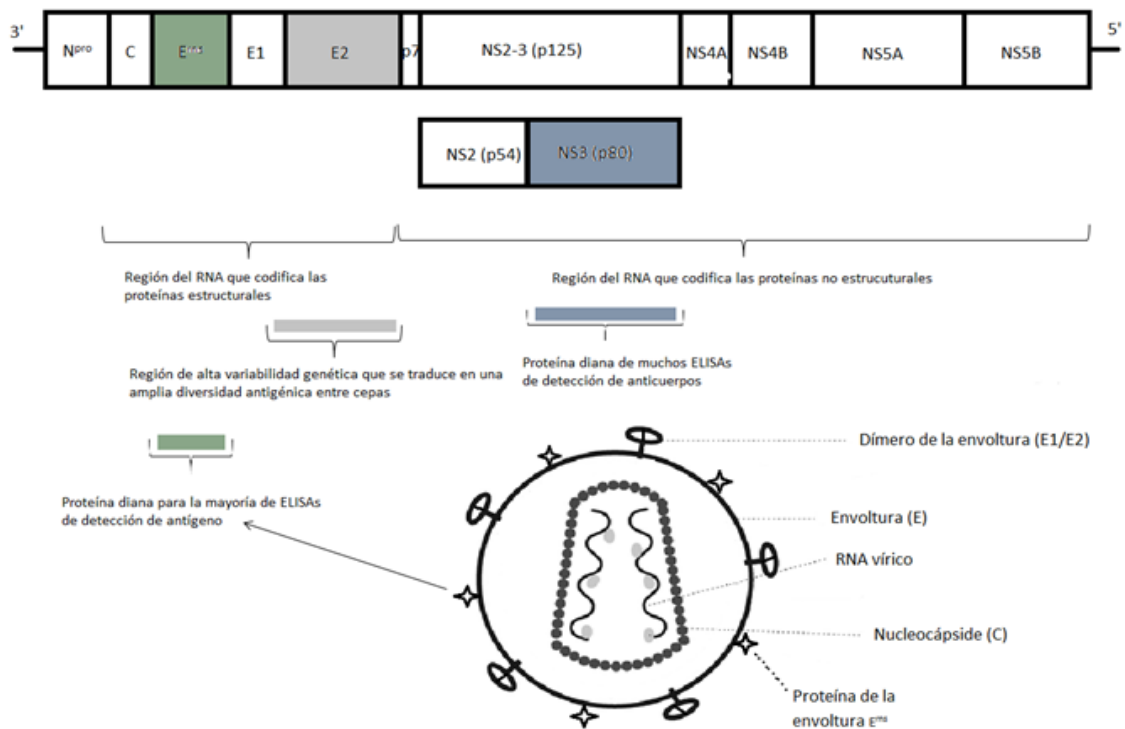


Figura 3. Estructura del BVDV y región del RNA que codifica para cada proteína.

Elaboración propia



Han sido descritos dos genotipos principales: BVDV-1 y BVDV-2, clasificados como dos especies diferentes dentro del género *Pestivirus*. En Europa predomina el

BVDV-1 mientras que en Norteamérica la prevalencia de ambos, BVDV-1 y 2 es similar (Lindberg *et al.*, 2006a).

Actualmente, el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) reconoce cuatro especies de *Pestivirus*: BVDV-1, BVDV-2, virus de la peste porcina clásica (CSFV) y enfermedad de la frontera (BDV), (Simmonds *et al.*, 2017). Además, un número creciente de candidatos a especie de *Pestivirus* de varios animales domésticos y salvajes han sido descritos: a) virus de la “Giraffe”, que comprende un aislado obtenido de una jirafa en Kenia que causó síntomas similares a los de la enfermedad de las mucosas, así como un aislado de bovino (Becher *et al.*, 2003; Becher *et al.*, 2013); b) virus “Pronghorn Antelope”, aislado de un antílope ciego en EE.UU. (Vilcek *et al.*, 2005); c) virus “Bungowannah”, que fue aislado en cerdos de Australia (Kirkland *et al.*, 2015); y d) los atípicos “HoBi-like” o BVDV-3, pestivirus detectados en suero y otras muestras de bovino y búfalo (Bauerman *et al.*, 2013). Recientemente, más supuestos *Pestivirus* han sido descritos, incluyendo Aydin-like virus, aislado de ovejas y cabras en Turquía (Postel *et al.*, 2015), *Pestivirus* porcino atípico, causante de temblor congénito en lechones (Hause *et al.*, 2015; Postel *et al.*, 2016), un *Pestivirus* de un murciélago (Wu *et al.*, 2012) y un *Pestivirus* de ratas (Firth *et al.*, 2014).

Por otra parte, el BVDV se clasifica en dos biotipos diferentes: citopático (CP) y no citopático (NCP) (Ridpath & Bolin, 1998), según el tipo de proteínas codificadas desde el RNA de su genoma (Neill, 2013) y el efecto que producen sobre los cultivos celulares “in vitro” (Heinz *et al.*, 2000; Lackner *et al.*, 2004; Friedgut *et al.*, 2011; Ridpath *et al.*, 2013).

Los cambios genómicos en los pestivirus resultan de tres procesos diferentes: 1) acumulación de mutaciones puntuales propias de la naturaleza de la polimerasa RNA, dependiente del RNA vírico; 2) recombinaciones de RNA no homólogo; y 3) recombinaciones de RNA homólogo. Asumiendo que el ritmo de mutación de los pestivirus es similar al de otros virus RNA podemos estimar que, aproximadamente, se introduce una mutación puntual por cada ciclo de replicación. (Domingo *et al.*, 1985; Becher *et al.*, 1999). Recombinaciones de RNA no homólogo pueden dar lugar a la formación de variantes CPs del BVDV y una gran diversidad de alteraciones genómicas se han descrito para pestivirus CPs (Chernick *et al.*, 2014).

Después de la descripción de dos tipos genéticos de BVDV-1 a principio de los años noventa (Ridpath *et al.*, 2010), al menos 21 tipos genéticos del BVDV-1 (BVDV-1a, a BVDV-1r) y 4 del BVDV-2 (BVDV-2a, a BVDV-2d) se han descrito hasta la fecha (Vilcek *et al.*, 2001; Giangaspero *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2008; Jackova *et al.*, 2008; Yesilbag *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2010; Yesilbag *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015; Giammarioli *et al.*, 2015; Yesilbag *et al.*, 2017).

1.2.2. Patogenia, respuesta inmune y cuadro clínico

La patogenia de la infección por el BVDV es compleja, ocasionando diferentes resultados según las infecciones sean pre- o post- gestación (Lanyon *et al.*, 2014):

- La infección de las hembras gestantes susceptibles origina infección fetal que puede llevar a muerte embrionaria, efectos teratógenos o al nacimiento de descendencia PI.
- La infección aguda transitoria con BVDV ocasiona viremia transitoria previa a la seroconversión y puede ocasionar alteraciones reproductivas e inmunosupresión que incrementa la incidencia de enfermedades secundarias.

1.2.2.1. Infección aguda transitoria

El vacuno de cualquier edad es susceptible de contraer una TI como resultado de una transmisión horizontal o a través de fómites contaminados (Thurmond, 2005). El período de incubación es de 6 a 12 días tras la exposición al virus, pero puede variar dependiendo de la cepa vírica, de su virulencia y de la dosis de virus transmitida (Evermann & Barrington, 2005). Una vez infectados, los animales con TI eliminan bajas cantidades de virus con las secreciones corporales, normalmente desde el día 3 al 15 post-infección, aunque se ha comprobado que puede durar hasta tres semanas (Thurmond, 2005). Una vez que los animales con TI dejan de ser infectivos y la excreción cesa, se estimula una respuesta serológica de anticuerpos y células T contra la cepa vírica infectante que confiere inmunidad de por vida (Evermann & Barrington, 2005; Lanyon *et al.*, 2014; Brodersen, 2014).

Las manifestaciones clínicas de las TIs pueden ser variables y se reconocen como dependientes de la cepa vírica infectante, así como de la edad y el estado inmunológico y reproductivo del animal en el momento de la infección. Los terneros y vacas no gestantes susceptibles transitoriamente infectados con BVD, o no presentan síntomas o lo hacen de manera leve, como: fiebre, disminución del apetito y diarrea (Grooms, 2004). Sin embargo, las TIs también reducen la producción y casi siempre resultan en disminución de la producción de leche en adultos y retraso en el crecimiento en terneros y animales jóvenes. Los toros susceptibles con TI pueden ver reducida su fertilidad y servir de reservorios para las hembras susceptibles (Brock *et al.*, 2005; Houe 2005; Schweizer & Peterhans, 2014).

La infección aguda transitoria continúa siendo una de las manifestaciones más importantes de la infección por el BVDV (Carman *et al.*, 1998; Liebler-Tenorio *et al.*, 2004; Lunardi *et al.*, 2008; Friedgut *et al.*, 2011). Cepas altamente virulentas del BVDV pueden producir lesiones similares a aquellas vistas en la MD, como severas ulceraciones extendidas por orofaringe, laringe y esófago, así como enteritis hemorrágica (Stoffregen *et al.*, 2000; Lunardi *et al.*, 2008; Friedgut *et al.*, 2011; Hessman *et al.*, 2012). Los síntomas clínicos observados consisten en inapetencia, letargia y reducción de la producción de leche, con un amplio rango de severidad.

Las TIs han mostrado ocasionar una reducción en las células blancas circulantes entre 3 y 14 días después de la infección (Bolin *et al.*, 1985; Liebler-Tenorio *et al.*, 2004). Esta reducción se asocia con inmunosupresión y aumento de la susceptibilidad a infecciones secundarias en los animales infectados, como mastitis y complejo respiratorio bovino (Kapil *et al.*, 2005; Grisset *et al.*, 2015). La mortalidad, como resultado de una TI, es rara; sin embargo, mortalidades superiores al 50% se han comprobado en brotes de BVDV-2 que inducen síndrome hemorrágico (Pellerin *et al.*, 1994; Gethmann *et al.*, 2015). No obstante, donde un brote de BVD ocurre concomitantemente con infecciones secundarias, como se vio con el complejo respiratorio bovino, la mortalidad se incrementa (Kapil *et al.*, 2005). La enfermedad respiratoria es exacerbada por la infección con BVDV (Fulton *et al.*, 2000) y el aborto se ha asociado con coinfecciones por BVDV y *Neospora caninum* (Björkman *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2004). La inmunosupresión se asocia con efectos directos del BVDV en los linfocitos T y B circulantes (Bolin *et al.*, 1985; Chase, 2013) y apoptosis de los linfocitos intestinales asociados al tejido linfoide (Pedrera *et al.*, 2012). La apoptosis de los linfocitos (Wilhelmsen *et al.*, 1990) y la supresión de la función fagocítica de los macrófagos (Marshall *et al.*, 1996) vía caspasa-9 (Pedrera *et al.*, 2012) en los linfonodos, tejido linfoide asociado a bronquiolos e intestino, disminuye la capacidad del sistema inmune de responder a otros agentes infecciosos.

El ganado infectado de manera aguda puede reponerse en tres semanas si otras infecciones no se superponen (Muller-Doblies *et al.*, 2004). El ganado vacuno infectado con BVDV recuperado clínicamente e inmunizado continúa, sin embargo, portando virus en las células mononucleares de la sangre periférica durante 98 días o más y la transferencia de la infección parece posible experimentalmente (Collins *et al.*, 2009), aunque la transferencia natural de la infección parece improbable (Lanyon *et al.*, 2014).

El BVDV puede mantener infecciones crónicas o prolongadas en lugares protegidos de la respuesta inmune después de una TI en una vaca, un ternero o un toro. Estas localizaciones son el tejido ovárico (folículos ováricos, células granulosa y ooquistes), túbulos seminíferos de los testículos, sistema nervioso central y leucocitos sanguíneos (Givens & Marley, 2013). El papel de las infecciones crónicas en mantener y diseminar el BVDV dentro de la población bovina aún no se entiende completamente.

1.2.2.2. Infección fetal

La infección de la madre en el primer trimestre puede dar lugar al nacimiento de un ternero persistentemente infectado (PI) (Brownlie *et al.*, 1998). La “ventana” para la creación de PIs se produce generalmente entre los días 40 y 125 de gestación, aproximadamente, con ocurrencias ocasionales tan tempranas como el día 18 y tan tardías como el día 125 (Grooms, 2004; Brodersen, 2014). La ventana puede variar de feto a feto como ilustran informes de un ternero PI con su gemelo seropositivo (Schoder *et al.*, 2004). La habilidad de las cepas NCP del BVDV para inhibir el

interferón tipo 1 en el feto (Charleston *et al.*, 2001; Peterhans & Sheizer, 2013) capacita al virus para sobrevivir en el hospedador y establecer animales PIs. Los animales PIs pueden ser clínicamente sanos, pero algunos son pequeños, débiles y sin crecimiento (Baker 1995) y son generalmente declarados como susceptibles a infecciones secundarias, sugiriendo una pobre función inmunitaria (Voges *et al.* 2006). Esto, combinado con la susceptibilidad a la MD, lleva a una escasa supervivencia de la mayoría de los animales PIs (Houe, 1993; Voges *et al.*, 2006), aunque datos recientes sugieren que hasta un 28% de los PIs de una población pueden pasar de los dos años de edad (Booth & Brownlie, 2012). Los animales PIs son generalmente transmisores mucho más eficientes del BVDV que los animales infectados transitoria o agudamente, pues son capaces de eliminar grandes cantidades de virus durante su vida y son considerados el principal reservorio del BVDV (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

En los animales PIs pueden ocurrir mutaciones de cepas NCPs persistentes junto con inserciones genómicas, resultando en poblaciones mutantes del virus CP. Esto conduce a que ambos biotipos, CP y NCP, circulen en animales PIs y den como resultado el desarrollo de la enfermedad de las mucosas (MD), que es invariablemente letal para el animal (Peterhans & Schweizer, 2010; Peterhans *et al.*, 2010; Decaro *et al.*, 2014).

1.2.2.3. Enfermedad de las mucosas

Existen clínicamente dos formas de MD, aguda y crónica, cuya presentación parece estar relacionada con el grado de homología existente entre las dos cepas que intervienen en el proceso (Factor, 2017):

- La MD aguda afecta a animales entre los 6 meses y los 2 años de edad. Cursa con fiebre, depresión, debilidad, anorexia, taquicardia, polipnea y disminución de la producción láctea, y posteriormente diarrea acuosa profusa y sanguinolenta de olor nauseabundo con emaciación y deshidratación. Se observan erosiones y/o úlceras en labios, encías, lengua, paladar, ollares, cavidad nasal y espacios interdigitales con ptialismo, flujo nasal y cojeras. Es frecuente que el proceso se complique con infecciones secundarias que agravan el estado del animal. La letalidad es prácticamente del 100% y se produce entre el segundo día y la tercera semana post-infección.
- La MD crónica se caracteriza por inapetencia, mal aspecto y pérdida progresiva de peso hasta la emaciación con diarrea continua o intermitente. En ocasiones se observan alopecias e hiperqueratosis en cuello, piel perineal, prepucial y vulvar, y en la inserción de cuernos y pezuñas. Son frecuentes, igualmente, las infecciones secundarias. Los animales pueden vivir durante meses y mueren como consecuencia de su extrema debilidad.

En la figura 4 se reflejan los diferentes cuadros clínicos que puede ocasionar la infección por BVDV.

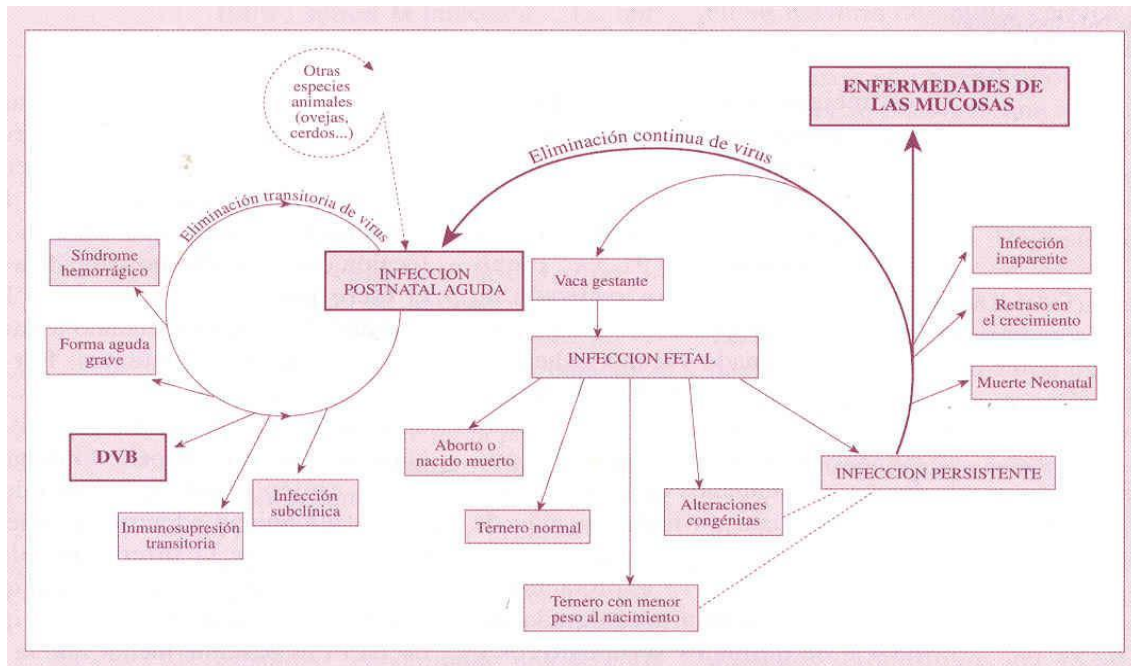


Figura 4. Ciclo de infección del BVDV con sus diversas formas clínicas (de la Fuente et al., 1996). Se dispone de permiso del autor.

Por otro lado, estudiar la interacción del BVDV con el sistema inmunitario es complicado debido a la diferente naturaleza de la infección (hiperaguda, aguda o persistente), la cepa del virus (cepas de laboratorio frente a cepas de campo, de alta virulencia frente a baja virulencia) y el biotipo (NCP frente a CP). Las infecciones agudas e hiperagudas interactúan con sistemas inmunes intactos mientras que los animales PIs tienen sistemas inmunotolerantes al BVDV.

Las infecciones agudas con cepas CPs son raras en el campo, ya que las cepas NCPs son las que predominan y las interacciones de los virus NCPs con el sistema inmune son completamente diferentes de las cepas de virus CPs (Chase, 2013). Las cepas NCPs del BVDV activan la inmunidad humoral adquirida más rápidamente (Lambot *et al.*, 1997; Lambot *et al.*, 1998) y circulan por más órganos inmunes, particularmente aquellos asociados a la inmunidad en mucosas; así mismo, el antígeno de cepas NCPs persiste más tiempo que el de las cepas CPs (Spagnuolo-Weaver, 1997).

Para los animales con TI se ha demostrado que la respuesta inmunitaria es distinta según la infección sea con virus CP o NCP, y que hay una más rápida y efectiva eliminación de las cepas CPs, comparadas con las NCPs, en estos animales (Peterhans & Schweizer, 2010); sin embargo, independientemente de la cepa presente, el biotipo NCP predomina en el campo.

1.2.3. Epidemiología

Aunque los *Pestivirus* fueron designados inicialmente de acuerdo con su hospedador original, las infecciones con BVDV han sido detectadas en diversas

especies domésticas y salvajes incluyendo vacuno, ovino, caprino, porcino, ciervos, búfalo, bisonte y alpaca. (Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.* 1999; Aguirre *et al.*, 2014).

1.2.3.1. Distribución geográfica y prevalencia

Los estudios serológicos han encontrado considerables variaciones en el número de animales positivos, con prevalencias que van del 18 al 90% (Bolin *et al.*, 1985; Durham & Hassard, 1990; Houe *et al.*, 1995; Eiras, 2009) y prevalencia de rebaños seropositivos desde el 0,15% en Finlandia al 98% en Sicilia, Italia (Eiras, 2009). Por otro lado, la prevalencia de animales PIs se encuentra entre el 1 y 2% de la población bovina (Houe *et al.*, 1995).

Se encontró que la prevalencia de anticuerpos anti-BVDV a nivel de rebaño, antes de la implementación de programas de control o erradicación variaba del 95% en Inglaterra y Gales al 1% en Finlandia (Greiser-Wilke *et al.*, 2003). En los países escandinavos, las regiones del sur con alta densidad de ganado vacuno y grandes rebaños tenían una prevalencia mayor del BVDV que las regiones del norte con densidades de población menores y rebaños de tamaño más pequeño (Houe, 1999).

En un metaanálisis sobre la prevalencia del BVD en la población bovina mundial se determinaron los siguientes rangos de prevalencia de animales PIs (Scharnböck *et al.*, 2018):

- Bajo ($\leq 0,8\%$) en Europa, Norteamérica y Australia.
- Medio ($> 0,8\%$ a $1,6\%$) en el este de Asia
- Alto ($> 1,6\%$) en el oeste de Asia

Las prevalencias de animales PIs y de animales seropositivos ha decrecido en Europa, mientras que la prevalencia del BVDV se incrementó en Norteamérica (Scharnböck *et al.*, 2018).

En Europa, se encontró que la BVD era endémica en todos los países en los que no se había implementado un control sistemático de la enfermedad. En dichos países, hasta un 50% de los rebaños tenían animales PI y el 90% del ganado vacuno había sido expuesto al BVDV durante su vida (Lindberg *et al.*, 2006a).

La prevalencia de los diferentes grupos genéticos sólo ha sido publicada por aquellos países que tienen programas de control en marcha y la presencia de BVDV-2 ha sido detectada en Alemania (Figura 5) (con importantes brotes clínicos en los últimos años), Bélgica, Francia, Holanda, Austria, Eslovaquia, Reino Unido e Italia (Lindberg *et al.*, 2006) y recientemente en Polonia y España (Factor *et al.*, 2016; Factor, 2017).

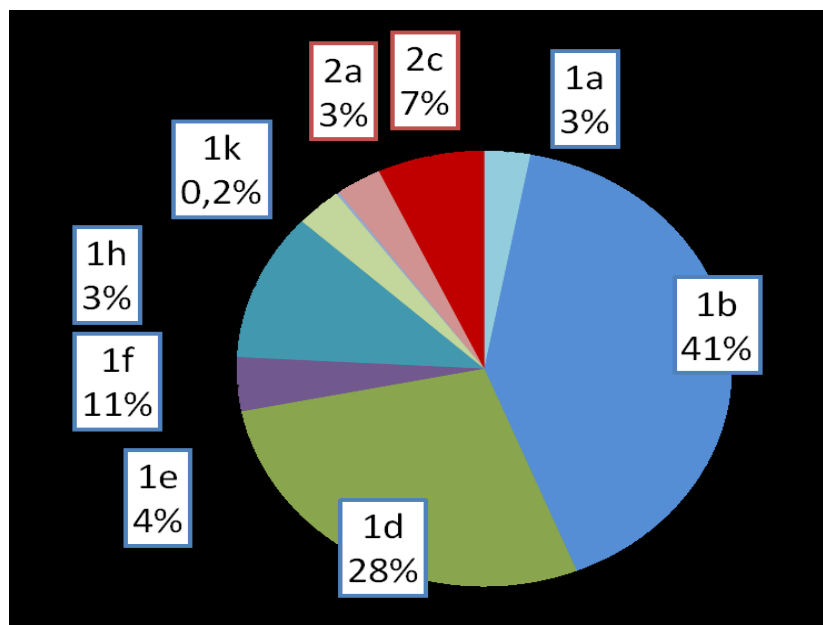


Figura 5. Genotipado de BVDV en Alemania entre 2008-2014. Elaboración propia, adaptado de Schirrmeyer (2014)

La prevalencia de la BVD en España no está clara debido al hecho de que se han llevado a cabo pocos estudios a nivel nacional, y los existentes tienden a basarse en la seroprevalencia, que al menos confirma la circulación del virus. Dichos estudios muestran una variada seroprevalencia, si bien, generalmente alta. Las variaciones en la prevalencia de anticuerpos se cree que son debidas a la densidad de ganado, las medidas de control y el uso de vacunas (Grooms *et al.*, 2014), así como a la posible influencia del clima y la temperatura (Botner & Belsham, 2012).

Todos los estudios identifican al BVDV-1 como la cepa circulante (Larghi, M., 2018). Así, en dos estudios de análisis filogenético del BVDV realizados en Galicia en los períodos 2013-2015 y 2015-2017, la mayoría de los aislados correspondieron al genotipo 1 (98,8% y 100% respectivamente), y solamente uno al genotipo 2. De los aislados estudiados, 73 (84,9%) y 137 (87,3%) fueron tipificados como BVDV-1b, mientras que la única cepa BVDV-2 fue clasificada como 2a (Factor *et al.*, 2016; Eiras *et al.*, 2019).

1.2.3.2. Factores de riesgo

Generalmente hay una alta correlación entre la densidad de ganado y la prevalencia de BVD en zonas endémicas (Lindberg *et al.*, 2006a). Por lo tanto, un factor importante que puede incrementar la prevalencia global de BVD es el incremento de la ganadería intensiva que se está produciendo en muchos países (Castel *et al.*, 2011; Guevara & Grünwalt, 2012; Scottish Government, 2016a), pues incrementa la densidad animal y el riesgo de proliferación de la infección de BVD (Houe, 1999).

Los factores de riesgo de introducción del BVDV incluyen tamaños grandes de rebaño, rebaños vecinos cercanos, contacto por encima del vallado, alto número de rebaños vecinos infectados, tenencia de novillas en pastos comunes y la compra de animales sin documentación de BVD (Lindberg *et al.*, 2006a). La probabilidad de tales factores de riesgo depende de las medidas de control implementadas a nivel de rebaño individual. Minimizar o eliminar estos riesgos es fundamental en cualquier programa de control de la BVD (Damman *et al.*, 2015).

La variabilidad en el estado de salud del ganado constantemente expuesto a animales PIs en los cebaderos probablemente depende de múltiples factores, incluyendo la edad, raza, estado nutricional e inmune del individuo, factores medioambientales como la exposición previa al BVDV, la duración del transporte, la presencia de otros patógenos, la densidad de animales, la ventilación, y factores del virus como la transmisibilidad y la virulencia de la cepa del BVDV a que están expuestos (Grooms *et al.*, 2014).

1.2.3.3. Transmisión del BVDV

Es bien sabido que la introducción de ganado nuevo en un rebaño es uno de los factores más importantes en la transmisión del BVDV. Muchos estudios han indicado que la compra de animales, particularmente vacas preñadas, aumenta el riesgo de introducción del BVDV en establos altamente susceptibles (Bitsch *et al.*, 2000; Santman-Berends *et al.*, 2017) y consecuentemente influir en el impacto económico del BVDV (Pinior *et al.*, 2019).

Por otro lado, el contacto con rebaños vecinos o el alojamiento común de rumiantes debe ser considerado un importante factor de transmisión del virus y por lo tanto de las pérdidas de producción (Graham *et al.*, 2016; Kaiser *et al.*, 2017).

Investigaciones epidemiológicas han demostrado que factores demográficos como el tamaño del rebaño y la densidad animal son buenos predictores de la prevalencia de la infección en poblaciones donde el BVDV es endémico (Ezanno *et al.*, 2008; Talafha *et al.*, 2009; Van Campen, 2010). Se observan altas prevalencias en rebaños con animales comprados en diferentes orígenes (Lindberg & Houe, 2005; Ezanno *et al.*, 2008). Debido a la naturaleza proclive al error de las polimerasas responsables de la transcripción del RNA, el BVDV es altamente mutable. Por tanto, hay un rango de virulencia entre los aislados de BVDV que van de infecciones subclínicas o enfermedades clínicas leves a síndromes severos fatales (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

Los animales PIs son primordiales en la transmisión del BVDV por excretar grandes cantidades de virus a lo largo de toda su vida, siendo incapaces de desarrollar anticuerpos. En contraste, los animales con TI son menos importantes para la transmisión de la enfermedad, a menudo exhiben síntomas leves y excretan el virus durante un período más corto de tiempo, 14 días aproximadamente (Brownlie *et al.*, 1987). Como ambos (PIs y TIs) son virémicos, es necesario llevar a cabo dos tests de

antígeno con un intervalo de, al menos, 21 días para poder distinguir los animales PIs de los TIs (Larson 2005). Alternativamente, se puede realizar una única prueba si se recopilan datos epidemiológicos (Marschik *et al.*, 2018), o usando tests específicos de diagnóstico como la inmunohistoquímica (IHC) en muestras de oreja (Brodersen 2004).

Los animales PIs eliminan continuamente grandes cantidades de partículas víricas con los fluidos corporales sin mostrar signos clínicos de infección. Un solo animal PI puede exponer repetidamente a todo un rebaño al BVDV durante un largo período de tiempo. Además, de la presencia de grandes cantidades de partículas víricas eliminadas por el animal PI, el BVDV es transmitido eficazmente a través de aerosoles a la mucosa nasal. Se cree que el contacto directo, nariz con nariz, es la más frecuente y efectiva vía de transmisión. Así mismo, se constató la diseminación del BVDV a través de instalaciones recién contaminadas (corrales, casetas, etc.) por la presencia de animales virémicos, sobre todo PIs (Niskanen & Lindberg, 2003).

El contacto indirecto con un PI, a través del equipo, puede extender la infección (Gunn, 1993; Lang-Ree *et al.*, 1994). Cualquier fluido corporal de un PI o el equipo contaminado debe considerarse un riesgo durante varios días, siete para ser prudentes (Niskanen & Lindberg, 2003). No obstante, el virus es muy frágil, por lo que las medidas básicas de higiene como los desinfectantes estándar y un cepillo serán suficientes para minimizar el riesgo derivado de la ropa y el equipo (Weir, 2012).

Los toros PIs a menudo tienen baja fertilidad aun cuando la calidad del semen parezca aceptable (Bielanski & Loewen, 1994). El problema más importante con los toros PIs es que son eficientes fuentes de infección para cualquier vaca con la que tengan contacto (Paton *et al.*, 1989; Kirkland *et al.*, 1997). La infección transitoria también puede afectar a la calidad del semen y estos toros son una potencial fuente de infección (Paton, 1989; Givens, 2003).

En Nueva Zelanda, “Cumulus” era un toro joven altamente valorado que dio resultado negativo a los tests de BVD, tanto para anticuerpos como para antígeno, cuando era un ternero. Sin embargo, cuando entró en los programas de selección genética, alrededor de los once meses de edad, resultó positivo a anticuerpos y a virus de la BVD en semen, pero no en sangre. Posteriores tests establecieron que padecía una infección persistente, pero localizada en los túbulos seminíferos. De los once meses de edad en adelante, Cumulus produjo semen infectado durante los once meses siguientes, momento en el que fue sacrificado, con 22 meses de edad (Voges *et al.*, 1999). Durante los posteriores quince años, se detectó un pequeño número de toros con infección persistente. Parece un resultado más bien escaso, pero no único, por lo que resulta conveniente testar de BVDV el semen de los toros, particularmente si son seropositivos (Brownlie & Booth, 2014).

El semen crioconservado es otra potencial fuente de infección (Kirkland *et al.*, 1994; Rikula *et al.*, 2008); sin embargo, con los métodos actuales de detección, se excluyen los toros PIs inmuno-tolerantes como sementales, aunque existe la

posibilidad teórica de que un toro transitoriamente infectado escape a los chequeos y produzca pajuelas contaminadas (Gaede *et al.*, 2004).

El trasplante de embriones también constituye un factor de riesgo para la transmisión entre rebaños. Si la hembra donante padece una infección, aguda o persistente, y el lavado del embrión no se realiza correctamente, podría transmitir el virus a la hembra receptora y esta, a su vez, al embrión transplantado o a otros animales del establo. En vacas PIs donadoras, se ha demostrado la presencia de grandes cantidades de virus en el moco vaginal y en el medio uterino (Brock *et al.*, 1991). El uso de suero contaminado para el lavado de embriones también puede transmitir el BVDV y desarrollar animales PIs (Bolin *et al.*, 1998). En un estudio (Gard *et al.*, 2010) se observó que todas las receptoras de embriones infectadas con BVDV, diez de diez, presentaron viremia y seroconversión después de la transferencia.

Aunque el control del BVDV se centra en la identificación y restricción de animales PI, otras vías de transmisión pueden resultar en nuevas infecciones, incluyendo el movimiento de animales preñados con PIs (animales troyanos), y la diseminación de la infección entre granjas contiguas. Esta última probablemente sea un importante problema en el programa de erradicación de la BVD en Irlanda dada la distribución espacial de la infección residual y la alta fragmentación del terreno en las granjas irlandesas (Graham *et al.*, 2016).

En un estudio sobre infecciones cruzadas de BVDV entre fauna silvestre y doméstica, realizado en la zona centro-sur de España, se secuenciaron 12 aislados de ciervo y 5 de vacuno en extensivo, todos ellos del tipo BVDV-1b, lo que sugiere que puede haber un virus común infectando a ambos (Rodríguez-Prieto *et al.*, 2016).

1.2.4. Diagnóstico

Las pruebas diagnósticas disponibles permiten detectar tanto el virus, antígenos específicos del BVDV, como anticuerpos contra el BVDV. Estos tests son generalmente reconocidos como muy fiables (Saliki & Dubovi, 2004; Dubovi 2013). Tanto si investigamos casos individuales de enfermedad con el objetivo de erradicar el BVDV de un rebaño o región, como si estamos identificando animales infectados que pueden ser una amenaza epidemiológica, es vital detectar certeramente el virus o los antígenos específicos. El aislamiento del virus, la detección de antígeno mediante la prueba ELISA, la inmunohistoquímica (IHC), la prueba de hibridación de ácido nucleico y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) son las principales técnicas para el diagnóstico de la BVD (Saliki & Dubovi, 2004).

1.2.4.1. Tests de detección del BVDV

Saliki y Dubovi en 2004 se referían al aislamiento del virus como la prueba de referencia (“gold standard”) para el diagnóstico del BVDV. Aunque esto continúa

siendo así hoy en día, el uso de la PCR es cada vez más frecuente, con la RT-PCR siendo ampliamente aceptada como el estándar para el diagnóstico de la BVDV (Hertig *et al.*, 1991). La RT-PCR es a menudo preferible al aislamiento del virus y es más rápida, más barata, no restringida a laboratorios con instalaciones para cultivos celulares y además es altamente sensible (Kim & Dubovi, 2003; Houe *et al.*, 2006).

La RT-PCR puede ser aplicada en muestras de tanque de leche para detectar vacas PIs. El máximo tamaño, teórico, de rebaño en el que se puede detectar un único animal PI se ha estimado en 5000 vacas en ordeño (Radwan *et al.*, 1995), mientras que, en la práctica, la detección de animales PI en el rebaño oscila entre, un animal PI para un rebaño de 132 vacas, a dos PIs para un rebaño de 800 (Drew *et al.*, 1999; Renshaw *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2010). Los animales que no están siendo ordeñados deben ser testados separadamente mediante muestras de sangre u oreja. El mismo principio se puede aplicar a los pools de muestras de suero (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2000). La aplicación de la RT-PCR puede detectar animales individuales infectados en “pools” de 50 sueros (Smith *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2011) debiendo individualizar la prueba en caso de resultado positivo. “Pools” más pequeños pueden resultar más económicos cuando estamos buscando un PI; por ejemplo, Muñoz-Zanzi *et al.*, en 2000, concluyen que la estrategia de “pool” más barata sería comenzar por “pools” de 20 e ir disminuyendo de 5 en 5 antes de individualizar el test.

La RT-PCR es uno de los métodos más sensibles para la detección de BVDV (Vaniddekinge *et al.*, 1992; Horner *et al.*, 1995) y se dice que es capaz de detectar incluso pequeñas cantidades de virus en infecciones agudas (Bhudevi & Weinstock, 2003). La presencia de virus en células mononucleares de sangre periférica se ha detectado hasta 98 días post-exposición al virus (Collins *et al.*, 2009). Sin embargo, la detección del virus en una única muestra es un resultado ambiguo que puede significar tanto una infección aguda como una infección persistente.

El ELISA de detección de antígeno representa una prueba simple y rápida de detección de animales PIs ideal para uso en situaciones como la monitorización de rebaños (Mignon *et al.*, 1991; Shannon *et al.*, 1991; Horner *et al.*, 1995). Las sensibilidades y especificidades de los ELISAs de antígeno oscilan entre el 67% y el 100%, y el 98,8% y el 100%, respectivamente, cuando lo comparamos con el aislamiento del virus (Shannon *et al.*, 1991; Mignon *et al.*, 1992; Sandvik & Krogsrud, 1995; Brinkhof *et al.*, 1996; Saliki *et al.*, 1997, 2000). Es una prueba robusta, simple y coste-eficiente. Se puede realizar en muestras de suero, leche y oreja, no requiere instalaciones para cultivo celular y resulta mínimamente afectada por el almacenamiento prolongado (Shannon *et al.*, 1991; Saliki & Dubovi, 2004).

La IHC es una de las pruebas de detección de antígeno de BVD más populares en EE. UU. (Driskell & Ridpath, 2006) y ha demostrado detectar animales PI con un 100% de sensibilidad cuando se usa en muestras de oreja (Cornish *et al.*, 2005); no

obstante, el mismo estudio demostró que la IHC ofrecía resultados positivos en algunas muestras de oreja de animales con infección aguda. Aunque la IHC es percibida como una prueba robusta y adecuada para grandes números de muestras, presenta desventajas en cuanto que se restringe a muestras de tejido, es laboriosa, propensa a errores técnicos y se basa en un sistema subjetivo de valoración por lo que requiere personal experimentado para asegurar la fiabilidad (Cornish *et al.*, 2005; Driskell & Ridpath, 2006) y no es fiable para muestras almacenadas 15 días en formalina (Khan *et al.*, 2011).

Debido a la excepcionalmente elevada carga vírica de un animal PI, la detección de PIs adultos es relativamente sencilla con diversos tests diagnósticos, incluyendo: aislamiento del virus, IHC, RT-PCR y ELISA de captura de antígeno, obteniendo sensibilidades y especificidades excepcionales (Saliki *et al.*, 2000; Kim & Dubovi, 2003; Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017). Si los rendimientos fuesen comparables, el ELISA de captura de antígeno sería el método preferido por ser más barato y menos laborioso, sin embargo, cuando se intenta diagnosticar un animal PI entre los terneros alimentados con calostro, la eficacia del ELISA de captura de antígeno es cuestionable, con posibles resultados falsos negativos (Shannon *et al.*, 1991; Shannon *et al.*, 1993; Brinkhof *et al.*, 1996; Bock *et al.*, 1997; Zimmer *et al.*, 2004).

Las muestras de oreja se han vuelto comunes en los últimos años para la detección de terneros/terneras PIs (Driskell & Ridpath, 2006). Estas pequeñas muestras de tejido auricular pueden analizarse por ELISA de antígeno, IHC, aislamiento del virus o RT-PCR (Cornish *et al.*, 2005; Kuhne *et al.*, 2005; Kennedy, 2006). Los sobrenadantes de las muestras de oreja se pueden utilizar para analizar por RT-PCR con buenos resultados (Kennedy, 2006). Se cree que los sobrenadantes pueden analizarse por ELISA antígeno sin interferencia de los anticuerpos maternos en terneros PI alimentados con calostro (Kuhne *et al.*, 2005). Las muestras de oreja pueden ser obtenidas por el propio ganadero lo que las convierte en una atractiva opción para la detección de PIs (Lanyon *et al.*, 2014).

1.2.4.2. Tests de detección de anticuerpos frente al BVDV

La detección de anticuerpos en ganado vacuno es una forma útil de determinar el estado inmunitario a nivel individual y cualquier exposición previa al BVDV. Un resultado positivo en un animal que no ha sido vacunado no solamente indica que el animal ha sido expuesto al virus, sino que tampoco es un PI. En un animal gestante el resultado podría indicar la posibilidad de portar un animal PI. Sin embargo, un resultado negativo no confirma que el animal no esté infectado; son necesarios posteriores análisis de virus o antígeno para confirmar que el animal no es un PI (Lanyon *et al.*, 2014).

A nivel de rebaño, o de una región, una alta prevalencia de resultados positivos a anticuerpos es indicativo de una alta probabilidad de que la población esté

actualmente infectada, esto es, existencia de al menos un animal PI. Es más, una baja seroprevalencia de anticuerpos en un rebaño o región sugiere que si se introduce la infección podría acarrear severas consecuencias y conduce a la necesidad de proteger cuidadosamente a la población. Inversamente, una alta seroprevalencia sugeriría que se obtendría poco beneficio de la vacunación contra la BVDV (Lanyon *et al.*, 2014).

Existen distintos métodos de detección de anticuerpos, que incluyen: un simple, barato, fiable y rápido ELISA (Hemmatzadeh & Amini, 2009), una prueba de inmunodifusión en gel agarosa (AGID) (Lanyon *et al.*, 2013) y un inmunoensayo basado en microesferas. Este inmunoensayo resulta tener una sensibilidad del 99,4% y una especificidad del 98,3% con respecto al ELISA (Xia *et al.*, 2010). Sin embargo, los métodos más extendidos para la detección de anticuerpos específicos frente al BVDV son la seroneutralización (SNT) y el ELISA de anticuerpos (Dubovi, 2013).

La SNT es altamente específica, pero es cara y lenta debido a la necesidad de cultivos tisulares (Cho *et al.*, 1991; Horner & Orr, 1993; Houe *et al.*, 2006) y puede presentar resultados variables entre laboratorios debido al uso de diferentes cepas de virus o tipos de células (Dubovi, 2013).

Se ha observado una relación positiva entre los resultados de anticuerpos ELISA y los títulos de SNT, así como entre los resultados de anticuerpos ELISA y las valoraciones AGID, que demuestran que los anticuerpos ELISA también proporcionan resultados cuantitativos (Lanyon *et al.*, 2013), con densidades ópticas, DO, que tienden a subir hasta 10-12 semanas post-infección.

Una variedad de muestras puede analizarse por ELISA, y como son rápidos y baratos, los ELISA de anticuerpos son una alternativa económica y eficiente a la SNT (Nettleton & Entrican, 1995).

Múltiples pruebas de ELISA están disponibles para la detección de anticuerpos específicos de BVDV y han sido validados para su uso en distintas muestras, incluyendo suero, leche individual y de tanque, y anticuerpos calostrales en terneros mamones (Fux & Wolf, 2013). El test de tanque de leche puede ser un método útil, eficiente y coste-efectivo para determinar la inmunidad del rebaño. La concentración de anticuerpos en tanque es indicativa de la prevalencia de vacas inmunes en el rebaño (Beaudeau *et al.*, 2001a; Eiras *et al.*, 2012) y también de la probabilidad de infección del rebaño (Beaudeau *et al.*, 2001a). Este método de identificación de rebaños con probabilidad de estar infectados arrojará resultado positivo, al contrario que el PCR de tanque cuando el animal PI no aporte su leche al tanque; por ejemplo, una vaca con mastitis, un toro o una novilla. Además, el test de anticuerpos en tanque de leche es de gran valor cuando se usa para monitorizar el rebaño regularmente pues se pueden detectar cambios en la seroprevalencia (Lanyon *et al.*, 2014).

Analizar muestras de suero por “pooles” con ELISA de anticuerpos puede estimar la seroprevalencia de los animales seleccionados para el pool (Lanyon *et al.*, 2014).

Esto es particularmente útil para los animales que no están en lactación, incluyendo animales jóvenes y vacas secas, o vacas de aptitud cárnica y toros.

1.2.5. Control

Como consecuencia del importante impacto económico de la BVD en los productores de ganado vacuno muchos países como Noruega, Suecia, Dinamarca, Finlandia, Austria, Suiza, Irlanda, Escocia, Inglaterra, Gales, Alemania, Irlanda del Norte, Bélgica, Países Bajos, y diferentes Estados en EEUU como Colorado, Alabama, Georgia, Mississippi, Montana, Oregon, Washington, New York y la península superior de Michigan, han implementado programas voluntarios u obligatorios de control o erradicación de la BVD (Evans *et al.*, 2018).

La monitorización y testaje periódicos junto con adecuadas medidas de bioseguridad para prevenir la reintroducción del virus son medidas necesarias para el control exitoso de la enfermedad (Lindberg & Houe, 2005), de tal modo que la implementación de medidas como la vacunación, el testaje y eliminación, el chequeo sanitario en los animales introducidos, el evitar el contacto con rebaños bovinos vecinos y otras medidas de bioseguridad, reducen significativamente las pérdidas de producción medias por animal y año (Lindberg *et al.*, 2006; Moenning & Becher, 2018; Pinior *et al.*, 2019).

Los enfoques coordinados de control de BVD normalmente implican (Evans *et al.*, 2018):

- El testaje directo de las poblaciones bovinas para el virus y el cribado serológico de rebaños para identificar aquellos con exposición reciente a BVDV.
- El testaje de los animales individuales dentro de los rebaños infectados para identificar y eliminar animales PIs.
- La implementación de medidas de bioseguridad como el doble vallado en los límites compartidos de la granja, la vacunación de los animales de recría susceptibles, la mejora de las prácticas de higiene de las visitas y equipamiento y el mantenimiento del rebaño cerrado para prevenir la transmisión de enfermedades.

La monitorización de los niveles de anticuerpos en la leche de tanque se mostró como un método útil para identificar cambios en el status de infección del BVDV, con un incremento significativo en los niveles de anticuerpos en los rebaños infectados con BVDV durante el período de seguimiento y una disminución progresiva en el título de anticuerpos en granjas con animal PI una vez eliminado este (Diéguez *et al.*, 2008); no obstante, la vacunación afecta al nivel de anticuerpos frente a la p80, por lo que el status de vacunación debe ser tenido en consideración cuando se interpretan los tests de anticuerpos en leche de tanque (González *et al.*, 2014).

La detección de animales PI en fases tempranas, particularmente después del nacimiento, es de un beneficio significativo para implementar en los programas de control de la BVD (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

Un aspecto fundamental de los programas de control y erradicación son las pruebas de diagnóstico (Givens & Newcomer, 2015). Las etapas del diagnóstico incluyen los tests para clasificar el status inicial del rebaño; posteriores tests para identificar y eliminar animales PIs de los rebaños infectados de BVD; y después una monitorización regular para confirmar el estatus negativo subsiguiente (Houe *et al.*, 2006). La buena correlación de los tests ELISA para anticuerpos en sueros sanguíneos y leche de tanque mostró como pruebas válidas para realizar la clasificación de un rebaño los citados tests usando las muestras de leche de tanque (Eiras *et al.*, 2012).

Todos estos aspectos se reflejan en la figura 6 con las diferentes fases que podrían llevarse a cabo para el control de la BVD en granjas de ganado vacuno lechero.

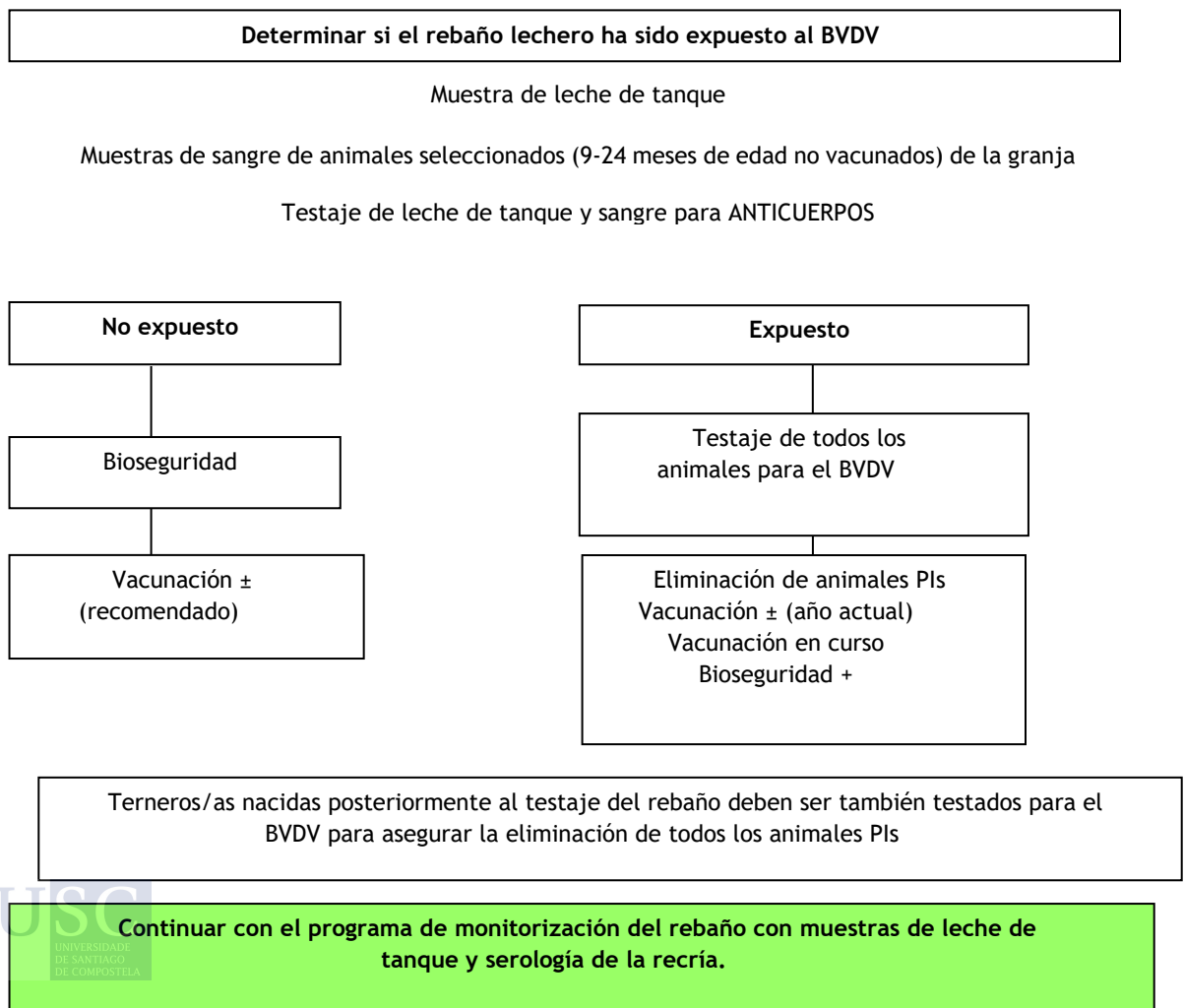


Figura 6. Estrategia de control para BVDV en un rebaño de bovino lechero (Sayers, 2014). Se dispone permiso de los autores

1.2.5.1. Vacunación

El propósito de cualquier vacunación sistemática es prevenir nuevas infecciones, reducir la diseminación de virus e incrementar la inmunidad del rebaño (Rauff *et al.*, 1996). Solamente cuando el rango $R_0 < 1$, esto es, un animal infectado infectaría menos de un animal susceptible, la infección decae. Con la mayoría de las enfermedades agudas, el porcentaje de animales no-susceptibles para alcanzar dicho umbral varía entre el 50 y el 95% (Woolhouse *et al.*, 1997). La vacunación solo será efectiva cuando se alcanza un mínimo de población protegida con suficientes animales no-susceptibles. Hay distintas enfermedades animales que pueden ser exitosamente controladas con vacunación sistemática. El caso más notable fue la peste bovina, que se erradicó a nivel mundial en el año 2011 (Mariner *et al.*, 2012). La habilidad del BVDV para producir PIs crea un reservorio de virus que está, constantemente, excretando grandes cantidades de virus infectantes. Así, el animal PI tiene amplia oportunidad durante su vida de encontrar e infectar nuevos animales susceptibles, incluso cuando el nivel general de inmunidad contra la BVD es alto. Esto en contraste con la mayoría de las enfermedades infecciosas donde la excreción es limitada temporalmente a unos pocos días o, más raramente, semanas. Incluso los virus que inducen latencia como los herpesvirus, no excretan continuamente sino más bien durante períodos cortos. En un entorno con una alta proporción de animales inmunes, un único animal infectado no será capaz de encontrar e infectar suficientes animales susceptibles para extender, o incluso mantener, la enfermedad. La BVD no puede ser comparada con otras enfermedades infecciosas porque se puede asumir que solamente con una inmunidad del 100% de la población se puede prevenir la aparición de nuevos PIs (Moennig & Becher, 2018).

Mientras que los programas nacionales y regionales de control y erradicación de la BVD no suelen incluir el uso de vacunas, en países en los que no existen programas de control organizados la vacunación es más frecuentemente usada para controlar la BVD (Houe *et al.*, 2006; Larghi, 2018). En Estados Unidos la vacunación ha sido ampliamente utilizada mientras que en Europa ha sido menos utilizada, excepto en Alemania (Damman *et al.*, 2015). En Europa, los países escandinavos y Austria y Suiza, que partían de prevalencias de rebaño bajas, implementaron con éxito programas de control sin usar vacunas, mientras que en países con seroprevalencias elevadas como Alemania, Bélgica, Irlanda, Gales, Escocia e Inglaterra la vacunación se utilizó como herramienta adicional opcional (Booth *et al.*, 2016; Moennig & Becher, 2018).

El análisis de diversos estudios sobre la eficacia de la vacunación frente a la BVD reveló un descenso de aproximadamente un 45% en los abortos y un 85% en las infecciones fetales en animales vacunados en comparación con los no vacunados (Newcomer *et al.*, 2015), lo que indica el beneficio de la vacunación en la prevención de alteraciones reproductivas asociadas al BVDV.

Las vacunas actualmente disponibles frente a la BVD contienen el virus inactivado o vivo modificado. Una posible preocupación con el uso de vacunas para el control de la infección es que la respuesta de anticuerpos inducida puede confundirse en los tests serológicos, aplicados como parte de la vigilancia de la enfermedad (González *et al.*, 2014). Aunque ha sido propuesto que las vacunas inactivadas presentan la ventaja sobre las vacunas vivas de no inducir anticuerpos detectables frente a la proteína p80 del BVDV (Graham *et al.*, 2003), sin embargo, la respuesta de anticuerpos a corto y largo plazo frente al antígeno p80 en una pequeña proporción de animales vacunados con vacuna inactivada puede interferir en el diagnóstico de la infección del BVDV dentro del rebaño (González *et al.*, 2014).

Las vacunas vivas modificadas presentan algunos inconvenientes:

- Pueden tener algo de virulencia y originar depleción linfocítica en las placas de Peyer, así como alterar las funciones de los linfocitos y neutrófilos (Brodersen, 2014).
- Pueden contaminarse por cepas de BVDV NCP, originando terneros PI después de la vacunación de hembras gestantes (Brodersen, 2014).
- Presentan un potencial de inmunosupresión, por lo que nuevas vacunas sin componentes inmunosupresores deben ser evaluadas en el futuro (Fulton, 2015).
- Consideraciones importantes a tener en cuenta ante cualquier programa de vacunación serían:
 - La seguridad de la vacuna y los niveles de protección que confiere (Larghi, 2018).
 - La diversidad antigénica y de cepa teniendo en cuenta las presentes en la región (Jones *et al.*, 2001; Fulton, 2015).
 - Vigilancia continua para identificar y caracterizar las cepas de campo emergentes y reformular las vacunas apropiadamente (Fernández *et al.*, 2009)
 - El momento de la vacunación para adaptarlo al plan de manejo del ganadero y al sistema de producción (Newcomer *et al.*, 2017).
 - Diseño de programas para reducir el nacimiento de terneros PI (Odeón, 2016).

Mantener el nivel de inmunidad alto en el rebaño es crucial para evitar la introducción de la enfermedad en la población (Roeder & Taylor, 2005); sin embargo, los modelos de simulación del BVDV sugieren que la vacunación solamente puede no ser suficiente para prevenir que el virus infecte el rebaño (Stott & Gunn, 2008).

La vacunación puede contribuir significativamente al control del BVDV; no obstante, es considerablemente más efectiva cuando se utiliza conjuntamente con medidas de bioseguridad para prevenir la entrada y circulación del virus en los

rebaños (Newcomer *et al.*, 2017). Es importante resaltar que la vacunación no es obligatoria en la mayoría de los países (Jones *et al.*, 2001); sin embargo, con el desarrollo de vacunas más seguras y efectivas, la vacunación puede jugar un rol más importante en el futuro control del BVDV (Larghi, 2018).

1.2.5.2. Medidas de bioseguridad

Deben aplicarse medidas de bioseguridad continuadas para evitar la introducción de la infección en rebaños libres de la misma, lo que es una parte fundamental de cualquier programa de control. La bioseguridad en la BVD incluye cualquier medida que ayude a la prevención de la diseminación de la infección entre rebaños. Mientras todas las granjas se benefician de las medidas de bioseguridad básicas, la implementación de medidas a gran escala acarrea grandes beneficios coste-eficacia, tiene un mayor efecto en la disminución del riesgo de transmisión entre rebaños y reduce significativamente la incidencia de nuevas infecciones (Lindberg *et al.*, 2006a).

La identificación y trazabilidad son clave en las medidas de bioseguridad y ayudan a controlar la diseminación de la BVD y gestionar las restricciones de movimiento del ganado. El movimiento de animales infectados desempeña un rol crucial en la diseminación de la enfermedad (Mitchell *et al.*, 2005) y el transporte de PIs es una de las principales vías por las que el BVDV se disemina (Tinsley *et al.*, 2012). Los países con programas de control regionales o nacionales pueden tener ciertas regulaciones, para los ganaderos asociados, que restrinjan el comercio de animales sospechosos de ser positivos o de estatus desconocido con respecto a la BVD (Marschik *et al.*, 2018).

Las medidas de bioseguridad son esenciales para ayudar a prevenir que los rebaños se infecten a través de la compra de animales o después de la reintroducción de animales a partir de ferias o certámenes ganaderos (Gates *et al.*, 2013; Eiras *et al.*, 2019). En Galicia, para las granjas bovinas en ADSG es obligatorio testar los animales comprados y retornados frente al BVD; además la participación en ferias y certámenes ganaderos es sólo del 2,1% (Moya *et al.*, 2018).

Por otro lado, el BVDV es capaz de sobrevivir en diversos materiales usados en la producción bovina que pueden actuar como fómites (personal, vehículos y equipos contaminados) (Evans *et al.*, 2019). Por ello, las medidas de bioseguridad recomendadas para evitar la transmisión indirecta incluyen evitar compartir equipamiento, o realizar la desinfección en el caso de que se compartan, y el proporcionar ropa y botas protectoras a los visitantes y restringir las visitas que contacten con los animales (Benavides *et al.*, 2021). Los vehículos de transporte de animales deben llegar vacíos, limpios y desinfectados antes de entrar en la granja, los vehículos con animales de otras granjas no deben entrar en la granja y los conductores no deberían tener contacto con los animales de la granja (Benavides *et al.*, 2021).

Un modelo cuantitativo de evaluación de riesgos puede ser una herramienta útil para apoyar la toma de decisiones sobre las medidas de bioseguridad que deben priorizarse para reducir la introducción de BVDV en rebaños bovinos lecheros (Benavides *et al.*, 2020).

Desafortunadamente la disposición de los ganaderos para aplicar estrictas medidas de bioseguridad en sus granjas está generalmente relacionada con el beneficio que puedan obtener (Smith & Grotelueschen, 2004). El diseño de un protocolo de bioseguridad en las granjas podría reducir no solo el riesgo de infección con BVDV sino también el riesgo de otras enfermedades que podrían afectar también a la salud y el rendimiento de los animales (Negrón *et al.*, 2011).

1.2.5.3. Beneficio económico de las medidas de prevención y control

Existe una carencia de estudios relacionados con la evaluación económica de las medidas de prevención y control del BVD, especialmente a nivel regional o nacional, y en sistemas de producción específicos (Piniór *et al.*, 2017); no obstante, la situación epidemiológica actual de la BVD demuestra que distintos países que han instaurado programas de intervención han reducido exitosamente la prevalencia de animales PIs:

- Austria pasó de 0,13% de animales PIs en 2006 a 3 PIs en tres granjas en 2017, y solamente uno de los tres casos fue una nueva infección (KVG. Tiergesundheitsbericht, 2017).
- Dinamarca bajó de 1,4% en 1988 a 0% en 2014 (Houe & Meyling, 1991).
- En Alemania la tasa de nacimientos de PIs disminuyó de 0,48% en 2011 a 0,01% en 2017 (FLI. Statistik zur BVD-Bekämpfung in Deutschland, 2018).
- En Irlanda el porcentaje de nacimientos de PIs disminuyó de 0,77% en 2013 a 0,12% en 2018 (Tratalos *et al.*, 2018).
- En Suiza la tasa de nacimientos de PIs disminuyó de 1,4% en 2008 a 0,02% en 2012 (Thomann *et al.*, 2017).
- Por último, Suecia, Finlandia y Noruega han erradicado totalmente la BVD (mayo de 2018) (Scharnböck, 2018).

El éxito de tales medidas de intervención ha provocado que las autoridades veterinarias nacionales de algunos países revisaran los protocolos de muestreo, cambiando de programas de control y/o erradicación a estrategias de testaje y vigilancia basadas en el riesgo, como son los casos de Austria desde 2018 solo para explotaciones no lecheras, Suiza desde 2012 y Dinamarca desde 2006, mientras que otros países como Irlanda están actualmente analizando la eficacia de diferentes estrategias de testaje (Thulke *et al.*, 2018).

Aunque las prevalencias en Europa han disminuido en el pasado, el prematuro cese de los esfuerzos de control debe ser tratado con precaución dado que las poblaciones de vacuno seronegativas son plenamente susceptibles al BVDV. Restricciones oficiales al comercio internacional no están teniendo lugar por el momento y la situación epidemiológica es desconocida en muchos países del mundo, resultando en un constante riesgo de reintroducción del BVDV en las regiones libres de la enfermedad. Estudios previos han demostrado que la mayoría de las nuevas infecciones pueden ser eficazmente reducidas si el comercio se somete a más estrictos controles (Lindberg *et al.*, 2001; Santman-Berends, 2017).

Las pérdidas directas por infecciones de BVDV fueron del 8-12% al 28-29% menores por animal y año en granjas que aplicaban vacunación y bioseguridad, respectivamente, comparadas con las que omitían estas medidas (Pinior *et al.*, 2019). Este resultado concuerda con el metaanálisis realizado por Newcomer *et al.* en 2015, que reveló que los abortos se redujeron un 45% y la tasa de infección fetal un 85%, aproximadamente, en rebaños cárnicos vacunados contra la BVD en comparación con los no vacunados. En contraste con la vacunación, las medidas de bioseguridad reducen más eficientemente las pérdidas de producción por BVDV. Esto puede estar relacionado con varias razones:

- El hecho de que los ganaderos a menudo fallen en la aplicación correcta de la vacuna y que no esté probado que las vacunas sean totalmente protectoras (Evans *et al.*, 2019), por ejemplo, en la prevención de la transmisión en útero del virus (Moenig & Brownlie, 2001).
- Las vacunas no proveen inmunidad de por vida, siendo necesarias revacunaciones periódicas (Weldegebriel *et al.*, 2009).
- Las vacunas vivas de BVDV pueden estar contaminadas con otros virus (Lindberg, 2003).
- El índice de protección crítico debe ser alcanzado para prevenir el nacimiento de nuevos animales PIs (Scharnböck *et al.*, 2018).

1.2.6. Pérdidas de producción asociadas al BVDV

Hace ya más de 15 años, el coste de las infecciones de BVD se estimó en 680 dólares americanos por animal en un rebaño infectado (Houe, 2003); no obstante, Ritcher *et al.* en 2017 demostraron que las pérdidas por BVD entre distintos países y dentro de los mismos, son enormemente heterogéneas en función del nivel monetario y el tipo de pérdidas; de tal manera que la extensión de la infección, las consecuencias clínicas presentes, la mortalidad, morbilidad, eliminaciones tempranas, animales nacidos muertos, abortos y reinfecciones tuvieron una influencia significativa en el nivel monetario de las pérdidas de producción (Ritcher *et al.*, 2017).

El impacto económico de la exposición constante a animales PI en cebaderos oscila desde un impacto nada significativo (O'Connor *et al.*, 2005; Booker *et al.*, 2008; Elam *et al.*, 2008) hasta pérdidas de rendimiento de 88,26 dólares americanos por animal o a adversidades que dan cuenta de pérdidas de 5,26 dólares por animal durante los 66 primeros días del período de alimentación (Hessman *et al.*, 2009).

En los rebaños irlandeses las pérdidas por BVD se calcularon en 102 millones de euros anuales (Byrne, 2010). Un brote agudo de BVD tiene distintos efectos negativos en los rebaños lecheros; reduce la eficacia reproductiva con lo que más vacas permanecerán vacías, también disminuye la producción láctea en las vacas y la ganancia de peso en terneros, incrementa la tasa de mortalidad y el riesgo de infecciones secundarias, así como la eliminación anticipada (Ózsvári *et al.*, 2001). El BVDV tiene un fuerte efecto inmunosupresor, lo que predispone a padecer diferentes enfermedades en rebaños lecheros, como neumonía, mastitis y enfermedades podales en vacas adultas, e incremento de la mortalidad y alteraciones respiratorias en terneras de recría (Diéguez *et al.*, 2009; Murphy, 2012).

Un brote agudo de BVD causó unas pérdidas medias de unos 85 € en Irlanda (Byrne, 2010), 137 € por vaca en Reino Unido (Benett & Mawhinney, 1999), 74 € por vaca en los Países Bajos (Wentink & Dijkhuizen, 1990) y 59 € por vaca en Dinamarca (Houe, 1994). Las pérdidas medias por vaca y año causadas por la BVD en Canadá rondan los 34 € (Chi, 2002), 31 € en Gran Bretaña (Gunn *et al.*, 2004) y 48 € en Irlanda (SAC, 2010). En Hungría, las pérdidas medias por vaca y año se estiman en unos 13,7 € - entre 4,3 y 23,1 € - (Szabara & Ózsvári, 2014).

Stott *et al.*, en 2012, identificaron pérdidas medias de producción anuales por animal dos veces más altas en rebaños de leche que en los de carne.

En una revisión sistemática de 31 publicaciones entre 1991 y 2015 para evaluar el impacto económico de la BVD se observaron rangos entre 0 y 552 £ por vaca y año. Los rebaños infectados endémicamente podrían experimentar un impacto de entre 6,46 a 87 £ por vaca y año, mientras rebaños con brotes agudos de virus virulento entre 28,5 y 2370 £ (Yarnall & Thrusfield, 2018).

Los factores epidemiológicos como el riesgo de introducción del BVDV, la prevalencia inicial, y la intensidad y duración de la circulación del virus pueden influir negativamente en los costes de las pérdidas de producción por animal; así, las pérdidas directas anuales medias fueron de 42,14 € por animal, pero cuando los 4 factores mencionados tenían un impacto negativo el coste por animal se incrementaba hasta los 67,19 € (Piniór *et al.*, 2019).

1.3. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA

La IBR es una importante enfermedad del ganado vacuno causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1); en su forma genital se denomina vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) / balanopostitis pustular infecciosas (IPB). Es un alfa herpesvirus,

por lo que puede establecer una infección latente en los ganglios nerviosos sensitivos, posterior a una infección primaria, que dura toda la vida. La infección latente puede ser reactivada por distintos factores estresantes y la subsecuente re-excreción del virus mantiene la infección en el rebaño. Una de las características de las infecciones causadas por el virus es su variabilidad en la gravedad de los cuadros clínicos -de severa y fatal, a benigna e incluso subclínica- siendo el resultado dependiente de la interacción entre el virus, el hospedador y el medio ambiente. Un diagnóstico preciso es crucial para el control de la enfermedad, siendo este posible gracias a las excelentes herramientas diagnósticas, el conocimiento de la biología del virus y a la disponibilidad de vacunas marcadoras (Nettleton & Russell, 2017).

1.3.1. Etiología

El BoHV-1 fue identificado y comunicado como agente causal de la IBR en 1956 (Martin, 2016).

El BoHV-1 es el más importante de los 8 herpesvirus conocidos - herpesvirus bovino tipo 1, tipo 2, tipo 4 y tipo 5, herpesvirus linfotrófico bovino, herpesvirus alcelafino tipo 1, herpesvirus ovino tipo 2 y herpesvirus suino tipo 1- que afectan naturalmente al ganado vacuno (Muylkens *et al.*, 2007). Se clasifica dentro del género *Varicellovirus* de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*, estrechamente relacionado con el virus de la enfermedad de Aujeszky, el de la varicela de los pollos y el herpesvirus humano tipo 3. El BoHV-1 presenta una estructura típica de alfaherpesvirus de 150 nm. de diámetro con una envoltura capsular icosaédrica que contiene una doble cadena lineal de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codifica para unas 73 proteínas y con una envoltura lipídica con proyecciones en forma de espícula (Figura 7). El genoma del BoHV-1 ha sido totalmente secuenciado (Schwyzer & Ackermann 1996; d'Offay *et al.*, 2013).

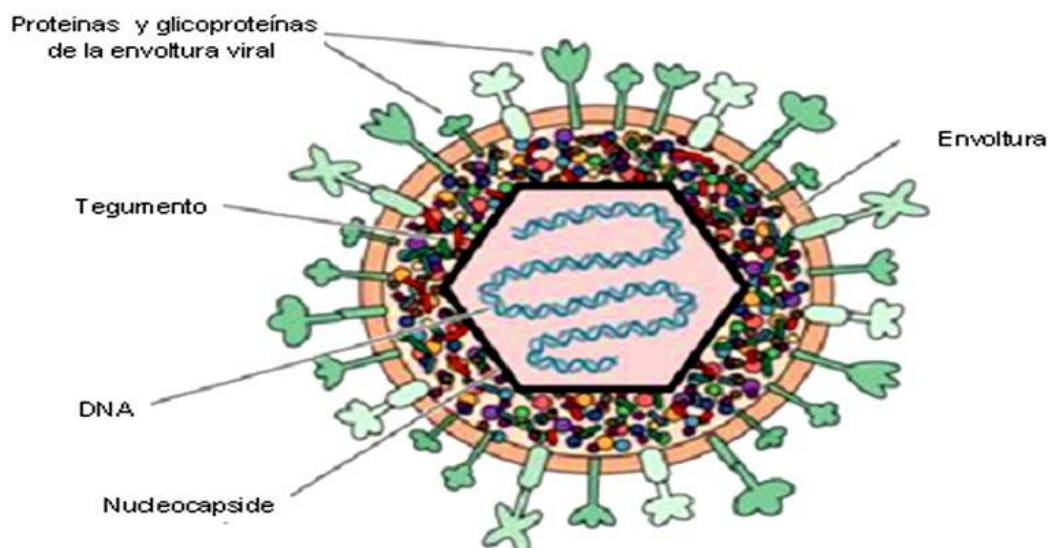


Figura 7. Representación esquemática de un herpesvirus. Se observa la cápside de simetría icosaédrica y las proteínas y glicoproteínas de la envoltura reflejadas como proyecciones (Flint, et al, 2004). Se dispone de permiso de la editorial

Las proteínas del virión BoHV-1 incluyen al menos 10 glicoproteínas de la envoltura que son designadas con la letra “g”, de glicoproteína, seguida de una letra que indica su identidad entre las proteínas de los herpesvirus. La glicoproteína mayoritaria en la envoltura es la B (Robinson *et al.*, 2008).

Mediante la supresión o la mutación de genes individuales del BoHV-1, cada gen se ha identificado como esencial o no para el crecimiento del virus en cultivos (Robinson *et al.*, 2008), de tal manera que los virus en los que el gen no-esencial para la glicoproteína E (gE) se ha eliminado, crecen bien en cultivos celulares y pueden usarse como vacunas marcadoras, pues los animales vacunados con este virus no producen anticuerpos frente a la gE por contraposición a los animales infectados con una cepa de campo de BoHV-1.

Los diferentes aislados de BoHV-1 son antigénica y genéticamente similares y estables, así que el riesgo de que surjan nuevas variantes antigénicas es bajo. Los aislados se pueden dividir en dos subtipos principales: BoHV-1.1 y BoHV-1.2. Los aislados procedentes de enfermedades respiratorias severas, vistas primeramente en cebaderos de EEUU, pertenecían al subtipo 1.1, mientras que los primeros aislados europeos de los virus asociados fundamentalmente con infecciones genitales y enfermedades respiratorias leves pertenecían al subtipo 1.2. El subtipo 1.2 se subdividió posteriormente en 1.2a y 1.2b (Biswas, 2013; Sayers, 2014). Solamente los subtipos 1.1 y 1.2b se cree que aparecen en Irlanda y Reino Unido predominando el subtipo 1.1 (Crook, 2011; Graham, 2013).

El ganado infectado con cepas de BoHV-1.1 excretan entre 10 y 100 veces más virus que los infectados con cepas BoHV-1.2 y es mucho más probable que extiendan la infección (Edwards *et al.*, 1990). Ambos aislados han sido recuperados de casos

de enfermedad respiratoria en EEUU (Fulton *et al.*, 2015). Diversas cepas seleccionadas de BoHV-1 aplicadas intravenosamente a novillas gestantes demostraron que las cepas de BoHV-1.1 y 1.2a eran capaces de causar aborto, mientras que la cepa 1.2b causaba infección fetal, pero no aborto (Graham, 2013).

Los aislados de BoHV-1 no manifiestan especial tropismo por el tracto respiratorio o genital. Experimentalmente, cepas causantes de IPV replican bien en el epitelio nasal y cepas que ocasionaban cuadros respiratorios replicaban eficientemente en el epitelio genital, indicando que la ruta de infección es más importante que la cepa del virus en la determinación de la presentación (Nettleton & Russell, 2017).

Un BoHV-1 que indujo patología neurológica fue inicialmente clasificado como BoHV-1.3, pero diferencias en su genoma y en las propiedades antigénicas llevaron a su reclasificación como BoHV-5. Se observó alguna protección cruzada entre el BoHV-1 y el 5, indicando cierto grado de similitud antigénica. Recientes secuenciaciones de los genomas del BoHV-1 han mostrado similitudes en el genoma, con cepas de BoHV-1.1 y 1.2b compartiendo al menos el 99% de la secuencia de nucleótidos, pero esta identidad desciende al 97,5% entre subtipos (Fulton *et al.*, 2015; d'Offay *et al.*, 2016). En contraste, BoHV-5 y BoHV-1 comparten menos del 85% de identidad en la secuencia (Delhon *et al.*, 2003).

Otras especies de ungulados pueden portar virus antigénica y genéticamente relacionados con el BoHV-1; así, virus aislados del búfalo de agua, reno, cabra, alce y ciervo rojo forman un grupo de alfa herpesvirus relacionados que incluyen BoHV-1 y BoHV-5 (Thiry *et al.*, 2006).

1.3.2. Patogenia, respuesta inmune y cuadro clínico

La vía de entrada del BoHV-1 son las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, el tracto genital o la conjuntiva (Muylkens *et al.*, 2007), conduciendo a una rápida replicación lítica y a la infección latente, especialmente en el ganglio sensorial (Levings & Roth, 2013a). La respuesta inmune bovina al BoHV-1 es rápida, intensa, equilibrada y de larga duración. El sistema inmune innato es el primero en responder a la infección, liberando interferones (IFNs) tipo I y citoquinas inflamatorias, provocando la muerte de las células infectadas y preparando la respuesta inmune adaptativa (Levings & Roth, 2013a). La inmunidad célula-mediada, que incluye linfocitos T citotóxicos destructores de las células infectadas, es crítica para la recuperación de la infección. La inmunidad humoral, que incluye anticuerpos neutralizantes y citotoxicidad célula-mediada dependiente de anticuerpos, es importante para prevenir y controlar las reinfecciones (Levings & Roth, 2013b). La supresión inmune del BoHV-1 contribuye a la gravedad de las manifestaciones clínicas y al complejo respiratorio bovino (Jones & Chowdhury, 2008; Jones, 2019).

El BoHV-1 posee diferentes estrategias de evasión de la inmunidad que incluyen: la inhibición de la producción de IFN tipo I y unión a quimiocinas y complemento,

la infección de macrófagos y neutrófilos, y la latencia (Muylkens *et al.*, 2007; Levings & Roth, 2013a).

El BoHV-1 puede volverse latente después de una infección primaria con aislados de campo o tras vacunación con cepas vivas atenuadas (Muylkens *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009). El DNA genómico del virus es generalmente detectable en el ganglio sensorial del nervio trigémino en la IBR y en ganglio espinal sacro en los casos de IPV/IPB (Levings & Roth, 2013). La latencia también puede ocurrir en tonsilas y en linfocitos sanguíneos. Cualquier factor estresante o la aplicación de corticosteroides puede inducir la reactivación del virus latente, resultando en la re-excreción del mismo y en el aumento de los anticuerpos neutralizantes (Nandi *et al.*, 2009; Jones, 2019).

En la figura 8 se reflejan las fases en la infección primaria y la reinfección a partir de animales con infección latente.

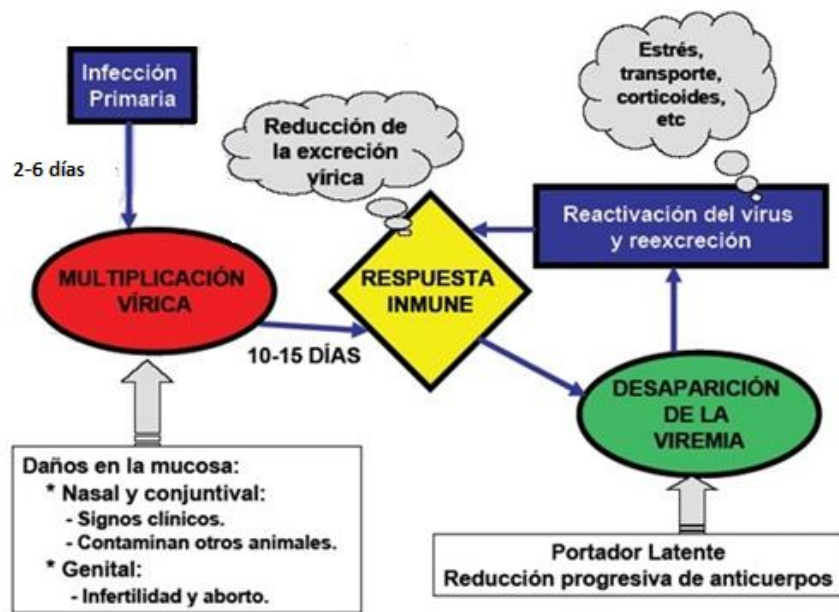


Figura 8. Ciclo de infección/reinfección del BoHV-1. Elaboración propia

El período de incubación de la IBR depende del modo de infección, de la virulencia y de la cantidad de virus que penetra en el organismo animal a través de la cavidad nasal, orofaringe, ojos y tracto genital. El BoHV-1 se multiplica en las células epiteliales del lugar de entrada y tras la viremia, es transportado a los órganos de multiplicación secundaria a través de puentes intercelulares, la sangre y el sistema nervioso, ocasionando diferentes cuadros clínicos (Zacarías, 2002).

La lesión primaria es la presencia de diversos focos de necrosis en el epitelio nasal, laríngeo, traqueal o genital, secuela directa de la replicación viral y su efecto citopático. Las lesiones pueden desaparecer para formar grandes pústulas que consisten en infiltrados masivos de leucocitos (Murphy *et al.*, 1999). Se ha descrito una amplia variedad de signos clínicos consecuencia de la acción del virus sobre los sistemas respiratorio, genital, digestivo y/o nervioso (Straub, 2001):

- La forma respiratoria de la enfermedad, IBR, es la más importante por su elevada morbilidad. Se caracteriza por fiebre, 40,5 a 42°C, depresión general, inapetencia, anorexia, abundante descarga nasal, inicialmente serosa y después mucopurulenta, dificultad respiratoria, exceso de salivación y en algunos casos aborto (Murphy *et al.*, 1999; Thiry *et al.*, 2006b). Los animales pueden desarrollar conjuntivitis, uni o bilateral, que se caracteriza por el desarrollo de inflamación y enrojecimiento de la conjuntiva y presencia de una secreción serosa al principio y mucopurulenta al final de la infección, con queratitis sin ulceración de la córnea si no se produce contaminación bacteriana secundaria (Obando, 1994; Pidone *et al.*, 1999).
- En las vacas la forma genital produce IPV y en los toros IPB. Se caracterizan por enrojecimiento y edema con pequeñas pústulas que al desprenderse dejan una zona erosionada. Presentan secreción mucopurulenta abundante tanto en la mucosa de la vulva como en la del pene (Obando, 1994).
- La forma digestiva de la enfermedad afecta a terneros de una a tres semanas de edad y cursa con fiebre, diarrea y lesiones necróticas de color blanco en la mucosa del tracto digestivo. Evoluciona en forma aguda con elevada mortalidad. La gastroenteritis puede ocurrir también en ganado adulto (Murphy *et al.*, 1999).
- El BoHV-1 puede causar ocasionalmente meningoencefalitis (OIE, 2004). También se han descrito casos de mastitis, enteritis, metritis, dermatitis, tonsilitis e infecciones sistémicas en animales jóvenes (Pidone *et al.*, 1999).

1.3.3 Epidemiología

1.3.3.1 Distribución geográfica y prevalencia.

El BoHV-1 es un virus de distribución mundial, aunque existen diferencias significativas en la prevalencia a nivel de rebaño y en la incidencia de la enfermedad, entre regiones y dentro de ellas, dependiendo de la geografía y de las prácticas de manejo del ganado. En países con explotaciones de ganado vacuno de aptitud láctea y cárnica, se han detectado prevalencias a nivel de rebaño entre el 70 y 85%. En dichos rebaños la prevalencia media es del 40-50%, con la mayoría de los animales seropositivos entre los adultos (Woodbine *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2014).

El efecto del BoHV-1 en un rebaño endémicamente infectado es impredecible. Un estudio inicial de tres años de duración en 20 rebaños holandeses que compraban animales de reposición demostró circulación en 12 de los rebaños, tres de los cuales

sufrieron enfermedad clínica (van Nieuwstadt & Verhoeff, 1983). Un estudio más reciente en nueve rebaños cerrados, en el condado de Kildare, Irlanda, reveló exposición primaria en dos rebaños y secundaria en todos ellos, sin evidencia de enfermedad clínica en ninguno de ellos (Geraghty *et al.*, 2012).

Una revisión en rebaños de leche y carne en el Reino Unido e Irlanda demostró un marcado incremento desde los años setenta (Nettleton & Russell, 2017). Estudios desarrollados entre 2002 y 2009 mostraron prevalencias de rebaño entre el 73 y el 83% y seroprevalencias del 28 al 42,5% intra-rebaño (Graham, 2013). La prevalencia media en rebaños de carne y de leche en Irlanda del Norte resultó ser del 77% (86,5% en los de leche y 75% en los de carne) (Cowley *et al.*, 2014). Otros datos interesantes fueron las significativas diferencias regionales y el alto porcentaje de rebaños en los que las novillas de reposición, mayores de 270 días de edad, eran libres de anticuerpos frente al BoHV-1 (Sayers *et al.*, 2015).

El virus ha sido erradicado de Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia, Suiza y Noruega (Ackermann & Engels, 2006), así como del estado federal de Baviera, en Alemania, y la provincia de Bolzano, en Italia (European Commission, 2017).

La situación en España es difícil de conocer porque los trabajos existentes se refieren a regiones y poblaciones muy concretas, variando las prevalencias de animales del 25 al 40% y las de rebaño del 17 al 96% (Eiras, 2009). En un estudio realizado en el año 2000 en Galicia, se detectaron prevalencias por animal de 38,4% (43,2% en leche y 26,8% en carne) y de 50,4% por rebaño (58,3% en leche y 48,1% en carne) (Eiras *et al.*, 2009).

1.3.3.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo de introducción del BoHV-1 en rebaños incluyen: compra de ganado, tamaño grande del rebaño, presencia de vacuno de leche, presencia de toro reproductor, alta densidad de rebaños en la zona, participación en concursos y visitas profesionales sin ropa protectora (van Schaik *et al.*, 2001).

La edad es un factor de riesgo para la seropositividad a BoHV-1 (Guarino *et al.*, 2008; Jacevicius *et al.*, 2008; Woodbine *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2010); así, los terneros tienen una menor prevalencia de infección (Boelaert *et al.*, 2005), aunque la incidencia de la seroconversión es mayor entre animales menores de 24 meses de edad. El declive de la inmunidad materna se asocia con un riesgo más alto de infección y seroconversión; esto conduce a una mayor prevalencia de anticuerpos anti-BoHV-1 en adultos, donde la tasa de seroconversión es menor debido a la inmunidad de rebaño (Woodbine *et al.*, 2009; Segura-Correa *et al.*, 2010).

Los machos son seropositivos con mayor frecuencia que las hembras, indicando que el sexo es un factor de riesgo (Boelaert *et al.*, 2005; Guarino *et al.*, 2008). Los toros tienen un mayor riesgo de infección que las vacas debido a que se mezclan más frecuentemente con otro ganado (Boelaert *et al.* 2005). El BoHV-1 puede transmitirse

en semen importado (Kupferschmied *et al.*, 1986), debido tanto a la contaminación del semen por el virus como a la transmisión indirecta por el personal (Kampa *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2010); sin embargo, el uso de monta natural en lugar de inseminación se reveló como un factor de riesgo para la seropositividad del rebaño (Dias *et al.*, 2013).

Los rebaños mixtos de ganado de leche y carne tienen un riesgo más alto de ser seropositivos que los rebaños exclusivamente lecheros (van Wuijckhuise *et al.*, 1998; Boelaert *et al.*, 2005). En Brasil, los rebaños de carne tenían una probabilidad más alta de ser seropositivos a BoHV-1 que los rebaños lecheros o mixtos (Dias *et al.*, 2013). En Irlanda no se encontraron diferencias significativas en las seroprevalencias frente a BoHV-1 entre los rebaños lecheros y los de carne (Cowley *et al.*, 2011), mientras que las prevalencias, de rebaño e individuales, así como las tasas de seroconversión, fueron mayores en los rebaños lecheros en Inglaterra (Woodbine *et al.*, 2009).

En la mayoría de los estudios hay una asociación positiva entre el tamaño del rebaño y la seropositividad a BoHV-1 (Boelaert *et al.*, 2005; Guarino *et al.*, 2008; González-García *et al.*, 2009; Woodbine *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2010; Segura-Correa *et al.*, 2010), aunque no exclusivamente (Stahl *et al.*, 2001). Los rebaños más grandes tienen mayor transmisión por contactos tanto dentro del rebaño como con otros rebaños (Woodbine *et al.*, 2009; Sayers *et al.*, 2015). En rebaños más pequeños, hay menos animales susceptibles a lo largo del año, así que la infección con BoHV-1 se mantiene por debajo del umbral epidémico (van Wuijckhuise *et al.*, 1998). En los rebaños más grandes, un flujo continuo en la entrada de animales susceptibles promueve la circulación del virus en curso (Raaperi *et al.*, 2010). El tamaño del rebaño es un agente potenciador para otros factores de riesgo como la compra de ganado y/o la recrudescencia de la infección a través del estrés o la exposición a otros virus (Nardelli *et al.*, 2008; Woodbine *et al.*, 2009).

1.3.3.3 Transmisión del BoHV-1

El ganado vacuno se considera el único hospedador natural, aunque otros ruminantes domésticos tienen sus propios alfa herpesvirus específicos de hospedador que producen reacciones serológicas cruzadas con el BoHV-1. Los búfalos, las cabras, las ovejas, el ciervo rojo y el reno pueden ser infectados experimentalmente con éxito por el BoHV-1, aunque no hay evidencia de que la infección cruzada ocurra en condiciones naturales, salvo una excepción (Thiry *et al.*, 2006). La excepción es un informe del sur de Italia que describe enfermedad reproductiva en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) estabulados. Este descubrimiento tiene implicaciones para el control del BoHV-1 en áreas donde el ganado vacuno y los búfalos son estabulados juntos (Fusco *et al.*, 2015); riesgo también identificado en la India (Rana *et al.*, 2011).

El BoHV-1 debe su elevada diseminación a la alta cantidad de virus producida durante las primoinfecciones y a la re-excreción de virus en los animales

latentemente infectados. Es comúnmente introducido en un rebaño por la compra o el contacto con animales bovinos con infección primaria o re-excretando el virus en aquellos con infección latente.

La principal fuente de infección para los animales susceptibles son los animales portadores del BoHV-1. En la figura 9 se reflejan los factores que conducen al establecimiento de animales portadores.



Figura 9. Tipos de animales portadores del BoHV-1. Elaboración propia.

El BoHV-1 puede ser transmitido horizontalmente mediante aerosoles y fómites contaminados (Muyilkens *et al.*, 2007). El movimiento de animales es considerado la principal causa de diseminación del BoHV-1 entre rebaños (Van Schaik *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2020); sin embargo, este virus también puede diseminarse debido a equipos contaminados compartidos, movimiento de vehículos entre granjas, trabajadores de granjas y visitantes (por ejemplo, veterinarios, transportistas, comerciales) (Van Schaik *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2021).

La transmisión vía aerosol se produce en distancias cortas dentro de un edificio, pero una distancia de 4,4 m. entre grupos de terneros ha sido estimada como suficiente para prevenir esta forma de transmisión (Mars *et al.*, 2000).

Hay evidencias de la transmisión del BoHV-1 mediante aerosoles, aunque se limita a unos pocos metros. Además, la excreción del virus en heces hace recomendable no esparcir el purín en fincas contiguas a los prados donde pasta el ganado por la posibilidad de formarse aerosoles contaminados (EFSA, 2006).

El BoHV-1 también puede transmitirse por contacto o ingestión de secreciones, excreciones y exudados contaminados. En la forma genital, las hembras con IPV pueden contagiar a los machos durante la monta natural, pudiendo desarrollar una IPB o bien actuar como portadores asintomáticos (Biswas *et al.*, 2013). Otra posibilidad de contagio es por vía seminal, pues los toros infectados pueden vehicular el virus en el semen, contagiando a hembras durante la monta natural o, más

raramente, por la inseminación artificial con dosis seminales contaminadas (Muylkens *et al.*, 2007).

1.3.4. Diagnóstico

El diagnóstico del BoHV-1 se puede realizar mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero de los animales. Cualquier animal positivo, es decir con anticuerpos, es considerado un portador y potencial excretor, salvo en terneros jóvenes que adquieren de forma pasiva anticuerpos de la madre mediante el calostro o en ganado sano vacunado (Favoreel *et al.*, 2000). Las técnicas de SN y ELISA son habitualmente utilizadas para detectar anticuerpos contra el BoHV-1 en suero de animales (Puntel, 1999; Kramps *et al.*, 2004; Manual OIE, 2004a). La técnica ELISA ha reemplazado a las demás pruebas serológicas debido a que prescinde de cultivo celular, es sensible, rápida y económica (Pidone *et al.*, 1999; OIE, 2004a; Nandi *et al.*, 2009).

En rebaños que no han sido vacunados los análisis se llevan a cabo normalmente usando el test ELISA de detección de anticuerpos frente a la gB, mientras que en rebaños donde se ha vacunado se utiliza el test de anticuerpos anti-gE.

Los rebaños en los que exista una alta prevalencia o animales jóvenes seropositivos son sospechosos de presentar circulación vírica. En estos casos, es necesario realizar una investigación de los animales con cuadros clínicos compatibles con la IBR y de todos aquellos que, aún sin sintomatología, puedan ser infectados asintomáticos o latentes (Solís-Calderón *et al.*, 2003).

En caso de aparición de problemas respiratorios o reproductivos tras la incorporación de animales nuevos en el rebaño, estos serían los principales sospechosos. Si, por el contrario, aún aplicando estrictamente las medidas de bioseguridad necesarias, se detectara un brote de IBR, se podría sospechar que el origen está en la activación de una infección latente (Pritchard *et al.*, 2003).

Debido a la característica del BoHV-1 de producir infecciones latentes (Pérez *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006), una muestra de suero única, positiva a anticuerpos, indica que el animal ha sido infectado, pero no que haya excreción vírica en el momento del muestreo. Para confirmarlo es preciso detectar antígenos virales en las secreciones (Lemaire *et al.*, 1994).

La identificación de los animales infectados es muy difícil ya que la mayoría de ellos no presentan síntomas y el BoHV-1 sólo es detectable en las secreciones durante la fase de multiplicación del virus en la mucosa de las vías de entrada. Por tanto, se puede intentar la identificación del virus a partir de muestras de secreciones nasales, oculares, prepuciales o vaginales. El aislamiento del virus en cultivos celulares sensibles al virus es una técnica muy específica y sensible pero costosa, laboriosa y lenta. El virus de la IBR produce efecto citopático (ECP) con redondeamiento celular, formación de sincitios, lisis y desprendimiento de las células infectadas (Lucas *et al.*,

1986; Anderson, 2000). Es un diagnóstico difícil porque la obtención de estas muestras es complicada y con frecuencia existen contaminaciones fúngicas o bacterianas que dificultan el diagnóstico (Espí *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2000).

Los animales recientemente infectados pueden ser testados tomando un hisopo nasal que puede ser analizado mediante PCR. Los animales que están en las fases iniciales de la infección por IBR excretan virus durante 3 o 4 días después de la infección y a medida que la enfermedad progresa disminuye la excreción de virus y se hace más difícil detectar el virus (Farmlab, 2018).

Otra alternativa de diagnóstico a partir de estas muestras es la inmunofluorescencia directa (IFD) que es una técnica más económica y rápida pero que requiere una gran especialización y su sensibilidad depende mucho de la fase de la infección en la que se recoja la muestra (Lucas *et al.*, 1986; Yus *et al.*, 1995; Mora *et al.*, 2000).

El ELISA es otra técnica para la detección rápida de antígeno viral; este puede ser capturado por anticuerpos, monoclonales o policlonales, en fase sólida (Pico *et al.*, 1997).

La identificación de virus en fetos es muy difícil ya que, en muchas ocasiones, la muerte del feto y su expulsión están muy separadas en el tiempo con lo que el virus ya no está presente (Anderson, 2000).

Se están desarrollando protocolos comerciales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del ADN del BoHV-1, que podrían ser una alternativa al aislamiento vírico y además parecen ser capaces de detectar animales con la enfermedad latente (Moore *et al.*, 2000; Muylkens *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2013).

Recientemente muchas técnicas de biología molecular como la PCR, la PCR en tiempo real (qPCR), etc. se consideran muy sensibles, rápidas, independientes de la calidad de la muestra y útiles en el diagnóstico de BoHV-1 (Kumari *et al.*, 2019).

1.3.5. Control de la IBR

Las medidas de bioseguridad recomendadas en la literatura que previenen la transmisión indirecta del BoHV-1 son el evitar compartir equipos, o realizar la desinfección de estos en el caso de ser compartidos, proporcionar ropa protectora individual y botas a las visitas o restringir el contacto de los visitantes con los animales (Van Schaik *et al.*, 2016; Benavides *et al.*, 20121). La provisión de ropa protectora a los visitantes demostró proteger contra la infección de BoHV-1 (Van Schaik *et al.*, 1998, 2001, 2002). Los vehículos que transportan animales deben llegar vacíos, limpios y desinfectados antes de entrar en la explotación. Los vehículos con animales de otras granjas no deben entrar y el conductor no debe tener contacto con los animales de la granja (Sarrazin *et al.*, 2014).

Dos estrategias principales se usan para controlar el BoHV-1: testaje y sacrificio de positivos o una estrategia basada en la vacunación (Raaperi *et al.*, 2014). Si la prevalencia de la población es relativamente baja, la estrategia más efectiva para la erradicación de la enfermedad es analizar los animales y eliminar los positivos. Fundamental en esta estrategia es disponer de un grupo de reproductoras libres de la enfermedad y protegerlas de ella a medida que los animales seropositivos son eliminados del rebaño y los seronegativos los reemplazan. Los esquemas de erradicación distan sin embargo de ser perfectos. Siempre existe el peligro de que un animal latente seronegativo permanezca en el rebaño y disemine la enfermedad. Un estudio demostró que la infección latente era posible en animales jóvenes que habían recibido inmunidad pasiva contra la IBR con el calostro (Martin, 2016).

La eliminación de animales positivos sin vacunación paralela ha sido el método más exitoso para erradicar el BoHV-1; sin embargo, esto puede ser considerado solamente cuando la seroprevalencia es relativamente baja. Para conseguir la erradicación del BoHV-1 es recomendable generar un stock de ganado libre para ir gradualmente eliminando los animales seropositivos y reemplazarlos por esta progenie negativa (Ackermann & Engels, 2006). Una estrategia de test y sacrificio se ha instaurado con éxito en Finlandia, Suecia, Noruega, Dinamarca, Austria y Suiza (Nylin *et al.*, 2000; Ackermann & Engels, 2006, Nuotio *et al.*, 2007; Akerstedt *et al.*, 2010; Blickenstorfer *et al.*, 2011), así como en la provincia de Bolzano en Italia.

La vacunación frente al IBR es ampliamente aplicada. En Norteamérica, las vacunas son usadas para prevenir o reducir los signos clínicos, mientras que en países de la UE las vacunas marcadoras han sido también empleadas en la erradicación del IBR. (Levings & Roth, 2013b).

Existen diferentes tipos de vacunas, concretamente vacunas vivas modificadas (MLV), vacunas inactivadas, vacunas de subunidades y vacunas marcadoras (Muylkens *et al.*, 2007; Jones & Chowdhury, 2008; Nandi *et al.*, 2009).

Tanto las vacunas MLV como las inactivadas frente a la IBR disminuyen el riesgo de aborto en un 60%, pero no previene completamente dicho riesgo (Newcomer *et al.*, 2017).

La vacunación como estrategia alternativa es más apropiada en poblaciones con altas prevalencias, o cuando la prevalencia es baja pero la población está en riesgo de ser infectada. Así que, a pesar de una baja prevalencia de BoHV-1 en un rebaño, la vacunación puede ser un medio de control apropiado si el riesgo de exposición al virus es alto. La habilidad del virus para pasar a estado latente causó problemas inicialmente a la hora de diferenciar animales vacunados seropositivos que no excretaban virus, de aquellos animales infectados con virus de campo que si lo podían hacer. Sin embargo, las vacunas marcadoras han permitido durante años la diferenciación entre grupos de animales vacunados e infectados (Martin, 2016).

Las vacunas marcadoras se basan en la eliminación de una o más proteínas víricas, lo que permite distinguir entre animales vacunados e infectados naturalmente, basándose en las respectivas respuestas de anticuerpos (Van Oirschot *et al.*, 1996). Existen diferentes tipos de vacunas marcadoras como gE-viva y gE-muerta. Los terneros vacunados a la edad de 7 semanas mostraron reducción tanto de los signos clínicos como de la excreción de virus a los siete días después de la vacunación intramuscular y tres días después de la vacunación intranasal. Los anticuerpos contra la vacuna marcadora eran detectables en la leche a las 2-3 semanas de la aplicación de la misma y persistían durante 2-3 años, o probablemente durante toda la vida (Biswas *et al.*, 2013). Las vacunas gE negativas, tanto vivas como muertas, ya se usan en programas de control o erradicación en la UE (Unión Europea, 2000).

La vacunación con vacunas marcadoras, junto con la eliminación de animales gE seropositivos, es una alternativa viable en países con elevadas seroprevalencias de BoHV-1 (Noordegraaf *et al.*, 1998; Ackermann & Engels, 2006; Jackevicius *et al.*, 2008). Cuando la prevalencia nacional desciende del 5%, los animales seropositivos restantes pueden ser eliminados (Noordegraaf *et al.*, 1998).

Las vacunas marcadoras permiten la diferenciación serológica entre animales infectados y vacunados, DIVA (Van Oirschot *et al.*, 1996), basándose en la ausencia de una o más glicoproteínas en la vacuna que sí están presentes en el virus de campo (Van Oirschot *et al.*, 1996, 1997). Las vacunas marcadoras basadas en la delección de la gE son ampliamente usadas en Europa, tanto vivas como inactivadas (Van DrunenLittel-van den Hurk, 2006). Después de la infección, pero no después de la vacunación, una respuesta de anticuerpos contra la proteína, o proteínas, específica puede detectarse usando pruebas diagnósticas específicas, por ejemplo, ELISA de bloqueo de anticuerpos anti-gE (Van Oirschot *et al.*, 1996).

Las vacunas vivas de BoHV-1 gE negativas inducen inmunidad temprana frente a la infección (Kaashoek & Van Oirschot, 1996; Patel, 2005); una protección importante puede alcanzarse en 7 días después de la administración intramuscular y puede administrarse pronto ante un brote (Patel, 2005). Sin embargo, la respuesta tanto celular como humoral, es superior en animales vacunados con una combinación de vacuna viva e inactivada (Vanopdenbosch & Kerkhofs, 1997; Kerkhofs *et al.*, 2003). Aunque las vacunas inactivadas inducen una fuerte respuesta de SN (Vanopdenbosch & Kerkhofs, 1997), las vacunas vivas atenuadas marcadoras demostraron inducir mejor protección al ganado que las vacunas inactivadas gE negativas (Bosch *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 2013).

La vacunación intranasal con vacuna viva marcadora proporciona protección en presencia de anticuerpos calostrales maternos (Patel, 2005). Algunas vacunas vivas marcadoras inducen pirexia de corta duración y descarga nasal (Bosch *et al.*, 1997; Patel, 2005), pero han demostrado ser seguras para su uso en ganado reproductor, incluyendo vacas gestantes y toros (Strube *et al.*, 1996; Patel, 2005).

La vacunación reduce la severidad de la enfermedad, la replicación viral y la transmisión, pero no es capaz de prevenir la infección; tampoco impide la latencia ni la reactivación de la infección (Lemaire *et al.*, 2000; Muylkens *et al.*, 2006; Thiry *et al.*, 2006b).

El R1 de la infección natural con BoHV-1 en rebaños no vacunados ha sido estimado entre 2,8 y 7 (Hage *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 2001). En estudios tanto experimentales como de campo, el uso de vacunas inactivadas y vivas resultó en valores medios para R1 de 2,28-2,60 y 0,92-1,50, respectivamente, indicando que brotes importantes aún se pueden producir en rebaños vacunados (Bosch *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados de estudios de campo con vacunas vivas e inactivadas demostraron que son altamente eficaces resultando en rápidos descensos de la seroprevalencia del virus de campo (Bosch *et al.*, 1998; Mackoschey *et al.*, 2007; Jacevicius *et al.*, 2008; Raaperi *et al.*, 2012; Raaperi *et al.*, 2015).

En la figura 10 se representan las diferentes acciones a realizar en un rebaño de 100 vacas en lactación para alcanzar un rebaño libre de BoHV-1.

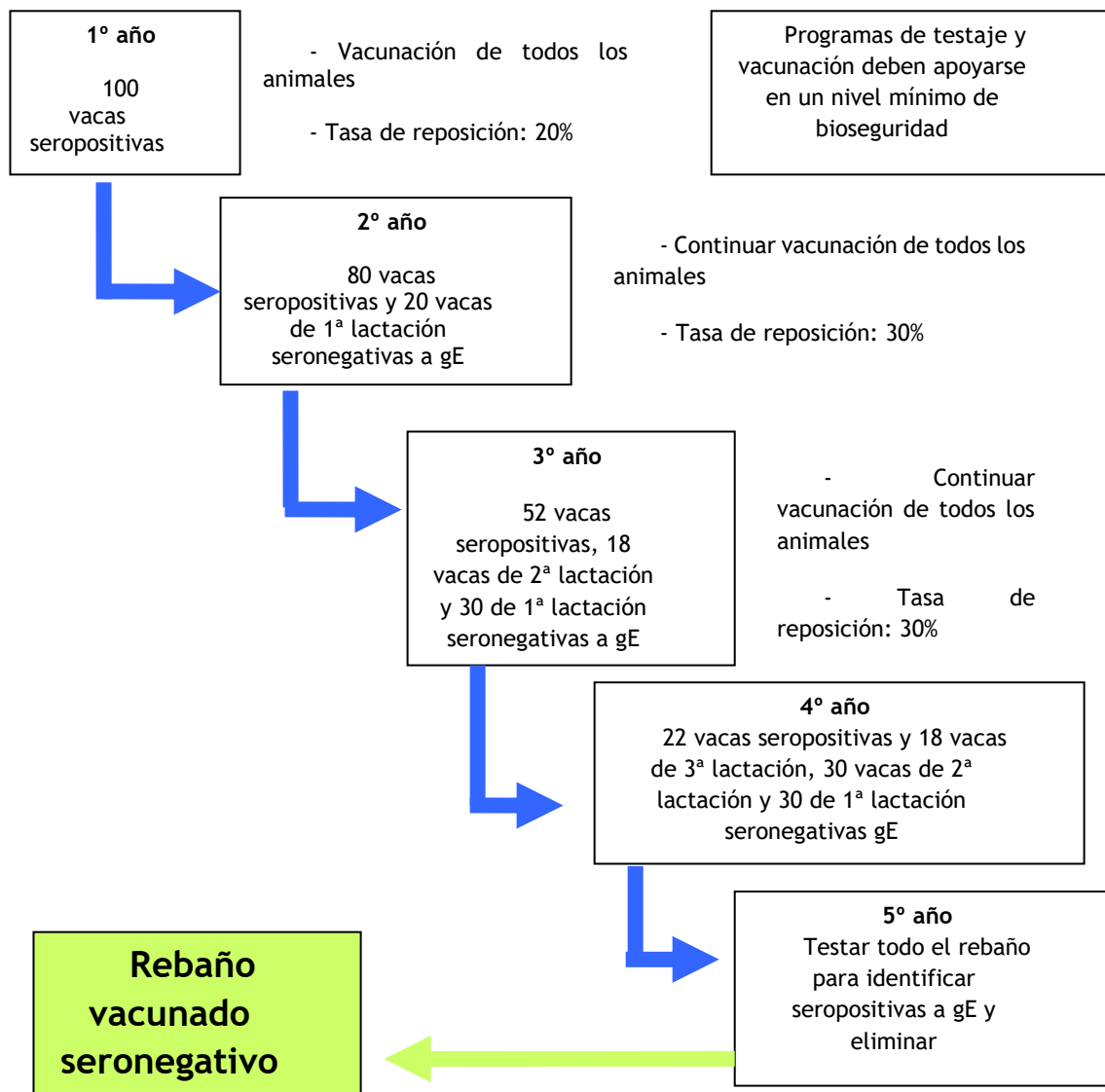


Figura 10. Fases para conseguir un rebaño seronegativo a BoHV-1 incorporando vacunación DIVA, reposición y eliminación (Sayers, 2014). Se dispone de permiso de los autores

Las razones en contra y a favor de la erradicación del IBR podrían sintetizarse en las siguientes (Ackermann & Engels, 2006):

- En contra:

- El elevado precio que conlleva el programa de erradicación
- La detección y eliminación de gran número de portadores subclínicos
- El vacío ecológico dejado por el BoHV-1 podría ser cubierto por otro virus

- A favor:
 - El incremento de la legislación internacional y de los argumentos políticos con restricciones a la exportación de animales de cría y de material genético (semes y embriones) a partir de países que aún no son libres del IBR.
 - Mejorar el status sanitario de nuestros rebaños
 - El uso de las vacunas tiene únicamente un valor temporal y limitado

Con el Real Decreto 554/2019 se establece el programa nacional voluntario de prevención, control y erradicación de la IBR en nuestro país en 2018. La situación actual en Galicia, en relación con otras CC.AA., es muy favorable, pues un alto porcentaje de explotaciones bovinas pertenecientes a ADSG podrían declararse libres de la enfermedad en un corto período de tiempo y a un coste no elevado dado el gran número de animales menores de 36 meses seronegativos que permitiría cubrir la reposición en las explotaciones bovinas positivas (Arnaiz *et al.*, 2018).

El objetivo de la vigilancia en el contexto de la erradicación de la IBR es la detección a tiempo de rebaños certificados como libres que se han infectado y así prevenir la difusión a otros rebaños certificados (Graat *et al.*, 2001; Raaperi *et al.*, 2014). El análisis de anticuerpos en el tanque de leche proporciona una herramienta útil y barata para determinar el estatus de un rebaño en relación con la IBR (Eliot, 1997; Hartman *et al.*, 1997; Paton *et al.*, 1998, Nylin *et al.*, 2000). El tanque solo resultará positivo cuando hay un mínimo de 10-15% de animales positivos a anticuerpos en ordeño (Hartman *et al.*, 1997; Raaperi *et al.*, 2010, Porquet Garanto; 2012). La sensibilidad y especificidad relativas a nivel de rebaño de un ELISA de bloqueo aplicado al tanque de leche rondan el 55-82% y 97,2-100% respectivamente (Eliot *et al.*, 1997; Nylin *et al.*, 2000; Raaperi *et al.*, 2010), pero la sensibilidad de los tests de tanque se puede incrementar mediante testajes repetidos (Eliot, 1997). Existe también un método de concentración de inmunoglobulina G para aumentar la sensibilidad de detección de IBR gE en tanque de leche que no afecta a la especificidad y permite la detección de prevalencias bajas (hasta un 4%) (Rebordosa-Trigueros *et al.*, 2012).

En un estudio más reciente, donde se evaluó un ELISA de detección de anticuerpos contra la glicoproteína E (gE) y otro ELISA de detección de anticuerpos contra la glicoproteína B (gB), se observó una correlación aceptable entre el nivel de anticuerpos en leche de tanque y la seroprevalencia intra-rebaño, especialmente para el ELISA de detección de anticuerpos anti-gB, lo que permitiría una clasificación inicial de rebaños en base al status sanitario y posteriormente monitorizar con muestras adicionales para el control de la infección por BoHV-1 (Martínez *et al.*, 2016).

1.3.6. Pérdidas de producción asociadas al BoHV-1

La IBR produce grandes pérdidas económicas ya que se relaciona con múltiples casos clínicos y subclínicos, tanto en vacas adultas como en la recria. Entre las vacas puede ocasionar abortos, infertilidad, síndrome respiratorio, pirexia, mastitis y disminución de la producción de leche (Figura 11). En cuanto a los casos subclínicos hay una sutil disminución en la producción de leche y alteración de su calidad, con mayor número de células somáticas (Statham *et al.*, 2015). También hay que tener en cuenta los riesgos de mortalidad y descarte prematuro, recaídas de la propia enfermedad y el riesgo de infecciones secundarias, como infecciones respiratorias bacterianas o metritis. Cuantificar el dinero del impacto del BoHV-1 a nivel de granja es complicado; hay que tener en cuenta tres áreas básicas: problemas reproductivos, pérdidas en la producción láctea y problemas respiratorios (Armengol, 2017):

- En la reproducción las pérdidas son diversas: infertilidad, con aumento del número de días abiertos y aumento del intervalo parto-concepción, con un coste medio de 2,20 € por día. Abortos; un aborto representa una pérdida media para una granja de entre 443 y 1140 €.
- En cuanto a las pérdidas en la producción láctea, en un estudio de dos años de duración, se estimó que las vacas seropositivas producían 2,6 litros menos al día que las seronegativas. Otro estudio cifra la pérdida anual por vaca en 1000 litros. Además, los animales seropositivos pueden tener un recuento celular más elevado.

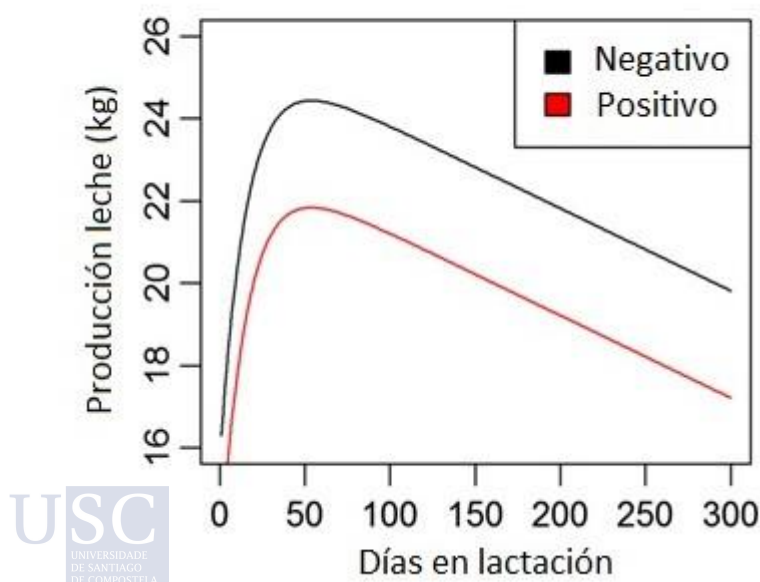


Figura 11. Curva media de lactación prevista según título de anticuerpos frente al BoHV-1 (Statham *et al.*, 2015). Se dispone de permiso de la revista

Las pérdidas económicas en Gran Bretaña oscilan entre 1 y 4 millones de libras al año, de 1,13 a 4,52 millones de €, según los distintos escenarios (Bennet, 2003). En otro estudio, en los Países Bajos, las pérdidas a nivel nacional oscilaban entre los 1000 y 300.000 florines, de 515,29 a 154.586,61 € (Noordegraaf *et al.*, 2000).

El BoHV-1 afecta negativamente la producción de los rebaños infectados resultando pérdidas económicas considerables en las granjas de leche debido a la pérdida de condición corporal, descenso en la producción láctea, aborto, muerte embrionaria, nacimiento de animales muertos, descenso de fertilidad, costes alimentarios extra y gastos para el control de la infección (Miller, 1991; Noordegraaf *et al.*, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2010, Ata *et al.*, 2012; Biswas *et al.*, 2013).

El BoHV-1 se ha asociado con infertilidad y pérdidas de producción láctea en el ganado (Biuk-Rudan *et al.*, 1999; Raaperi *et al.*, 2012; Graham, 2013; Sayers, 2016). La infección antes de la fertilización provoca ciclos irregulares (Givens, 2006), mientras que los efectos abortígenos son resultado directo de contraer la infección, en el período medio-tardío de gestación, por animales jóvenes (Muylkens *et al.*, 2007). El virus también puede presentar impacto sobre la producción de descendencia viable debido al efecto inmunosupresor y al establecimiento de infecciones bacterianas secundarias (Fairbanks *et al.*, 2004; Sharon *et al.*, 2013).

La infección con BoHV-1 puede provocar muerte embrionaria temprana y aborto (Anderson, 2007; Raaperi *et al.*, 2012a), ambos pueden prolongar el intervalo entre partos y disminuir la tasa de partos. El aborto puede además ocasionar un aumento de vacas abiertas disminuyendo la eficiencia del sistema de producción lechera (Patton, 2012).

Distintos estudios no han podido demostrar la asociación entre la infección por BoHV-1 y unos pobres resultados reproductivos (Hage *et al.*, 1998; Pritchard *et al.*, 2003; Waldner & Kennedy, 2008). Sin embargo, Raaperi *et al.*, (2012a) demostraron que la infección con BoHV-1 es un factor de riesgo para una elevada incidencia de abortos y un alto índice de inseminaciones en animales reproductores. Semeja que estudios a mayor escala son necesarios para determinar las posibles consecuencias en la fertilidad del BoHV-1.

El BoHV-1 es un colaborador del síndrome respiratorio bovino (SRB) conjuntamente con el BVDV, el virus de la parainfluenza-3 (PI-3) y el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV). El SRB es causa de morbilidad y mortalidad especialmente en cebaderos de terneros (van Drunen Littel-van derHurk, 2006). El BoHV-1 puede predisponer a neumonías bacterianas secundarias (Narita *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2002; Nandi *et al.*, 2009) y es esperable que las tasas de mortalidad sean superiores en rebaños con BoHV-1. Sin embargo, en Irlanda es común mezclar calostro de distintas vacas (Kennedy *et al.*, 2014) por lo que es improbable que los terneros nacidos, incluso en rebaños moderadamente seropositivos, sean completamente seronegativos en las primeras etapas de la vida lo que puede contribuir a disminuir la tasa de mortalidad de los terneros.

Una significativa diferencia estadística se constató entre los rebaños seropositivos y seronegativos tanto de producción láctea como cárnica. Los resultados mostraron un 9% de descenso en la producción para los de carne y un 10% para los de leche (Can *et al.*, 2016), representando unas pérdidas medias para estos últimos de 379 €, con un descenso diario de 0,68 kg de leche (Hage *et al.*, 1998). Aunque del Fava *et al.* en 2006 no encontraron un efecto significativo en el peso de los animales infectados, en el presente estudio se encontraron diferencias estadísticamente representativas con respecto al peso de los animales seropositivos y seronegativos (Can *et al.*, 2016).

En vacas multíparas de Irlanda, los rebaños positivos a BoHV-1 en tanque de leche producían una media de 250 litros menos por vaca y año, y también una reducción en los registros de grasa y proteína. Dependiendo del precio medio de la leche en un año determinado las pérdidas, debidas a la infección subclínica por BoHV-1, podrían ascender a 6000 € por año en un rebaño de 100 vacas con agrupación de partos en primavera. El coste de un brote clínico de IBR puede ser considerablemente superior dependiendo del estado de lactación, el número de vacas afectadas, el grado de enfermedad de las mismas y el nivel de mortalidad (Sayers, 2016).

Hage *et al.*, en 1998, describieron una significativa disminución en la producción de leche de 9,52 kg durante un período de infección de 14 días en animales seronegativos a BoHV-1 que se infectaban con el virus. Statham *et al.* en 2015 informaron de pérdidas en la producción láctea de 2,6 kg por día en animales seropositivos comparados con los seronegativos. Un modelo holandés cuantificó las pérdidas en 0,92 Kg. de leche por vaca y día durante un brote de BoHV-1 (van Schaik *et al.*, 1999). Raaperi *et al.* en 2012 destacaron que los rebaños con una seroprevalencia entre 1 y 49% tenían un mayor riesgo de aborto, odds ratio=7,3. Moeller *et al.* en 2013 informaron que el 2% de los terneros enviados para realizar necropsia al California Animal Health and Food Safety Laboratory (Tulare, California), durante un período de 6 años, tenían lesiones compatibles con infección sistémica por BoHV-1.

Aunque rendimientos por debajo del nivel medio debido a la infección por BoHV-1 han sido ampliamente comunicados, debe hacerse notar que muchos estudios han arrojado resultados contradictorios. Por ejemplo, los resultados en cuanto a pérdidas reproductivas no han podido relacionarse con la exposición al BoHV-1 en rebaños de aptitud cárnica (Waldner, 2005; Waldner & Kennedy, 2008) ni en rebaños lecheros durante una infección subclínica de BoHV-1 (Hage *et al.*, 1998). Estos resultados contradictorios es más que probable que se deban a diferencias en el momento de la infección, distintos tipos de rebaños investigados - carne frente a leche -, las jurisdicciones dónde se llevó a cabo el estudio y los sistemas de manejo de los animales utilizados en dichas jurisdicciones. Esto realza la importancia de completar investigaciones específicas en una determinada región y sistema de manejo del ganado (Sayers, 2016).

1.4. BIOSEGURIDAD

Dentro del contexto de la producción animal, la bioseguridad se define como el conjunto de medidas que reducen la oportunidad de los agentes infecciosos de penetrar y/o extenderse en una explotación ganadera (Thrusfield, 2007).

La bioseguridad en una explotación implica una gestión integrada de las prácticas de manejo, las prácticas sanitarias y de las estructuras de la explotación para evitar la introducción de agentes infectocontagiosos entre los animales del rebaño (bioexclusión o bioseguridad externa), o su diseminación entre los animales de esta granja o a otras explotaciones, en el caso de estar presentes ya en la granja (biocontención o bioseguridad interna) (Rojo *et al.*, 2016).

En la mayoría de los países europeos la bioseguridad se alcanza a través de una combinación de medidas legisladas a nivel nacional y otras medidas voluntarias a nivel de granja. La importancia de las medidas de bioseguridad en granja fue enfatizada en la Estrategia de Salud Animal de la Unión Europea 2007-2013: “prevenir es mejor que curar” (European Commission 2007/2013), recomendando a los ganaderos mantener un alto estándar de bioseguridad en sus granjas.

La implementación práctica de la bioseguridad en las explotaciones de vacuno lechero requiere el conocimiento de los agentes infectocontagiosos y del comportamiento de las infecciones en las poblaciones bovinas (Yus, 2016):

- La capacidad de los agentes infecciosos para ser diseminados a partir de animales infectados
- Su capacidad para permanecer en el medio externo del animal, siendo infectivos
- Las vías o mecanismos de transmisión a animales susceptibles (tabla 1).

Contacto directo	Animales infectados (enfermos, en período de incubación o portadores subclínicos) incorporados, reintroducidos o en contacto con ellos, o con sus secreciones o excreciones fisiológicas o patológicas (heces, exudados nasales, etc.)
Contacto indirecto	Vehículos, equipos, instrumental, botas, vestimenta, material biológico, etc. contaminados
Personas	Personal de la granja, veterinarios, transportistas, comerciales, etc. contaminados
Cadáveres	Si no han sido eliminados adecuadamente
Otros animales	Roedores, insectos, pájaros, perros, gatos, ovejas, animales silvestres, etc. Infectados o contaminados
Ingestión	Agua y/o alimentos contaminados
Contaminación ambiental	Purines, camas, aerosoles o polvo contaminados

Tabla 1. Métodos de transmisión de los agentes infecciosos y parasitarios en una granja bovina.

La compra e introducción de nuevos animales en un rebaño supone un riesgo significativo de introducir enfermedades infecciosas, como la BVD o la paratuberculosis bovina (McKenna *et al.*, 2006), especialmente allí donde la bioseguridad es inadecuada.

La entrada de animales en una explotación mediante la compra de nuevos animales, animales compartidos con granjas vecinas o animales propios reintroducidos en el rebaño tras el uso de pastos comunales o después de concursos o ferias, junto con el contacto directo entre animales de otras explotaciones vecinas, representan el mayor riesgo de entrada de enfermedades en una explotación; con objeto de reducir este riesgo, la medida de bioseguridad más importante es mantener el rebaño cerrado. Muchos ganaderos consideran que tienen un rebaño cerrado porque crían sus propias novillas, pero un rebaño no es cerrado si: se compra, se toma prestado o se comparte semental; los animales van a ferias y/o concursos; se comparten instalaciones como mangas de manejo; se reintroducen directamente animales tras una feria o concurso; se hace uso de pastos comunales; se realiza pastoreo en zonas donde pueden entrar en contacto con ganado vecino (Rojo *et al.*, 2016). Aunque la importancia relativa de las diferentes vías de transmisión depende del agente infeccioso en cuestión, un rasgo común para la mayoría de las infecciones es que su diseminación puede estar influenciada por las rutinas de higiene y las estrategias de bioseguridad aplicadas en la granja.

1.4.1. Beneficios de las medidas de bioseguridad

La bioseguridad es crucial para salvaguardar el ganado de las enfermedades infectocontagiosas; sin embargo, la efectividad de las medidas de bioseguridad es difícil de demostrar en el campo en ausencia de un brote. Los ensayos realizados no son una aproximación óptima, porque es un reto difícil extrapolar los resultados obtenidos a las condiciones de campo (Lindberg & Hoe, 2005).

Además, existe una clara falta de información publicada cuantificando el impacto de la bioseguridad ante el riesgo de introducción de una enfermedad, y esto a pesar de las extensas recomendaciones disponibles sobre la importancia del manejo de la salud del rebaño.

Las grandes explotaciones ganaderas tienen más probabilidad de sufrir mayores pérdidas económicas en caso de un brote infeccioso; esta puede ser una de las razones por las que las explotaciones de gran tamaño suelen aplicar protocolos de bioseguridad más estrictos que las pequeñas (Hoe & Ruegg, 2006; Nöremark *et al.*, 2010; Simon-Grifé *et al.*, 2013).

Por otro lado, la diseminación de enfermedades infecciosas entre el ganado es una amenaza continua para el bienestar y la salud de los animales, así como para la economía de los ganaderos. Además, los brotes de enfermedades pueden tener repercusión en el comercio de los productos de origen animal. Por ello, las prácticas de bioseguridad no solo protegen a la granja individualmente del riesgo de introducción de enfermedades y las pérdidas financieras asociadas, sino que también son un componente primordial para una amplia preparación contra la entrada de enfermedades exóticas animales (Acord & Walton, 2004), y protección de la integridad de la cadena de alimentación (Enticott *et al.*, 2012; Levings, 2012).

Actualmente puede existir una falta de comprensión del valor económico de la bioseguridad como protectora del mercado, así como promotora de la salud animal y pública, y consecuentemente de la seguridad alimentaria (Heikkila, 2011); no obstante, las mejoras en bioseguridad aportan beneficios a las granjas individualmente protegiendo la salud del rebaño, a la sociedad mejorando la seguridad de los alimentos y a la economía nacional apoyando el comercio internacional.

1.4.2. Transmisión de conocimientos y opiniones sobre bioseguridad de los veterinarios

La formación de los ganaderos fue la medida percibida por los expertos como la más importante y efectiva para proteger a los animales de enfermar (Kuster *et al.*, 2015).

La profesión veterinaria tiene un papel crucial en la promoción de la bioseguridad como medio de protección de los rebaños frente a la introducción de enfermedades (Caldow, 2004; Sibley, 2010) y disfruta de un amplio respeto entre los ganaderos y

el público en general como proveedores de recomendaciones expertas e independientes; sin embargo, para ser plenamente eficaces en este aspecto, los veterinarios deberían identificar y valorar su rol como garantes de una cadena de alimentación sana (Enticott *et al.*, 2011; Maye *et al.*, 2012); dicha posición debería reflejarse en la educación y formación veterinaria (Waage & Mumford, 2008; Wall, 2009). Además, la opinión de los expertos es una opción valiosa para reunir conocimiento en un campo donde los datos de campo fiables e imparciales no son fáciles de obtener (Gustafson *et al.*, 2012).

En un estudio llevado a cabo a través de entrevistas a veterinarios del Royal College of Veterinary Surgeon, en Inglaterra, se destaca que el papel de los veterinarios no debe limitarse solamente a la información, sino también a comunicar su perspectiva y valores en cuanto a bioseguridad a los ganaderos (Shortall *et al.*, 2016). El control de las enfermedades debe alcanzarse por medio de una buena relación interpersonal entre el ganadero y el veterinario, asumiendo aquél la responsabilidad en cuanto a las medidas de bioseguridad. Se ha sugerido que la decisión conjunta entre ganadero y veterinario es necesaria, y que un paso a menudo olvidado es el de escuchar al ganadero y establecer objetivos comunes (Atkinson, 2010).

Podemos disponer de información esencial en medidas de bioseguridad, pero para ser implementada en el rebaño debe ser comunicada de manera efectiva, lo que requiere un buen comunicador que genere confianza. Por lo tanto, los veterinarios deberían recibir formación en comunicación con el objetivo de ser reconocidos por los ganaderos como asesores fiables en la salud del rebaño y la bioseguridad (Kristensen & Jacobsen 2011).

En una encuesta realizada entre 62 veterinarios ingleses dedicados a la clínica del ganado bovino se indicaron los siguientes resultados (Pritchard *et al.*, 2015):

- Todos los profesionales aseguraron entender qué significaba el término bioseguridad y la mayoría indicaron que los protocolos de bioseguridad eran útiles cuando se aplicaban correctamente en las granjas; no obstante, el 92% los definían en relación con la prevención o control de las enfermedades y sólo el 26% a la prevención desde el punto de vista de la entrada en la explotación sin hacer referencia a la salida de la enfermedad de la granja.
- El 84% de los veterinarios declararon que adoptarían protocolos de bioseguridad al visitar granjas, proponiendo todos limpiar y desinfectar la ropa de protección y el calzado.
- El 84% informaba a los ganaderos sobre las medidas de bioseguridad en la granja, pero únicamente el 56% en cuanto al aislamiento y cuarentena de los animales que llegaban a la explotación. El 43% de los veterinarios dedicaban cierto tiempo a discutir planes de bioseguridad con sus clientes.

- El 52% de los encuestados declararon que la falta de conocimiento y entendimiento de los protocolos de bioseguridad era la causa de que no fueran aplicados, el 40% la falta de tiempo y el 24% la falta de hábitos en bioseguridad.

En la figura 12 se reflejan los resultados obtenidos por Renault *et al.* en 2018 a través de una encuesta online realizada a veterinarios clínicos belgas en relación a la importancia de las enfermedades infectocontagiosas del ganado vacuno, a su frecuencia, su carácter zoonótico (Havelaar *et al.*, 2010; McIntyre *et al.*, 2014), la interacción con rumiantes salvajes (Ciliberti *et al.*, 2015), a las políticas y prioridades de la Unión Europea, y la presencia de brotes en los bovinos (ANSES, 2012; Humblet *et al.*, 2012).

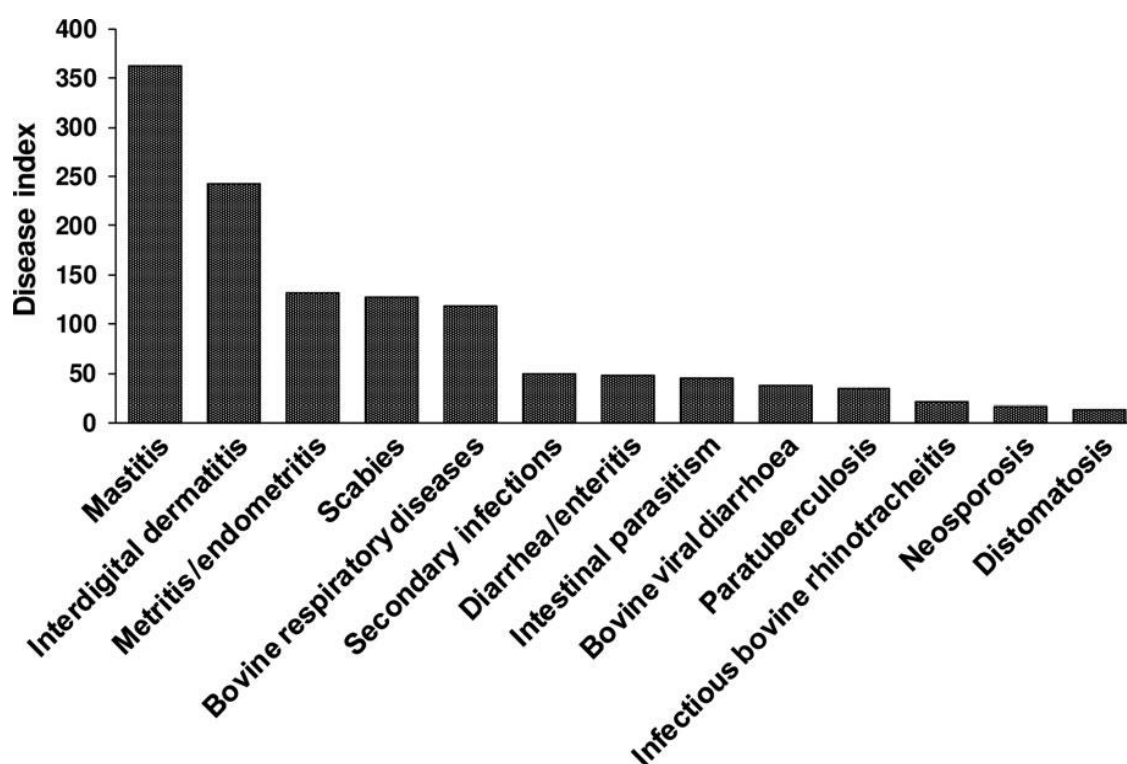


Figura 12. Índice de enfermedad de los procesos infecciosos y parasitarios más importantes que afectan al ganado vacuno adulto (índice sobre percentil 0.66) (Renault *et al.*, 2018). Se dispone de permiso de la revista

Los resultados pueden servir de orientación a la hora de tomar decisiones para los programas de control futuro. Por lo tanto, identificar los factores de riesgo y las medidas de bioseguridad asociadas puede utilizarse para mejorar la orientación técnica de los ganaderos y la respuesta a los problemas que les afectan.

La formación del ganadero en bioseguridad es un factor importante a la hora de implementar medidas de bioseguridad (Ellis-Iversen *et al.*, 2010; Nampanya *et al.*, 2012; Toma *et al.*, 2013), siendo esencial describir el efecto protector y el potencial beneficio de las distintas medidas; esto les permitirá centrarse en las medidas de bioseguridad relevantes para su tipo de producción y los riesgos de enfermedad que afrontan, optimizando así gastos en tiempo y recursos (Firestone *et al.*, 2012). Se ha

sugerido que el momento elegido y el método de comunicación podrían ser importantes (Hall & Wapenaar, 2012).

1.4.3. Opiniones sobre bioseguridad de los ganaderos

El punto de vista del ganadero a menudo refleja un guión cultural que determina su percepción y forma parte de su razonamiento a la hora de tomar decisiones (Vanclay & Enticott, 2011).

La postura de los ganaderos frente a la bioseguridad varía con la enfermedad (Moore *et al.*, 2008) y si existe o no actuación por parte del gobierno como en el caso de enfermedades notificables y/o legalmente penalizables como la fiebre aftosa, tuberculosis o las zoonosis alimentarias, mientras que el estatus de salud favorable puede contribuir a una relajación en la actitud de los ganaderos frente a la bioseguridad.

Obviamente el actor principal es el ganadero y en qué medida los ganaderos aplican rutinas de bioseguridad y están dispuestos a invertir tiempo y dinero para aumentar su nivel de bioseguridad depende de muchos factores. Uno de los factores principales puede ser el hecho de que el ganadero considere importante y/o posible la prevención de enfermedades (Frössling & Nöremark, 2016). Además, otras actitudes y aspectos como factores sociales y políticos pueden ser importantes (Gunn *et al.*, 2008; Heffernan *et al.*, 2008; Kristensen & Jakobsen, 2011; Lam *et al.*, 2011). Así mismo, los factores económicos, como compensaciones o penalizaciones, pueden influir en el comportamiento del ganadero en esta materia (Ellis-Iversen *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2011; Toma *et al.*, 2013).

Algunos autores españoles reflejan que la decisión de implementar medidas de bioseguridad puede estar influenciada por distintos factores psicológicos y sus interacciones (actitudes y comportamientos) (Moya *et al.*, 2019). El estudio identificó la importancia de las experiencias personales de los ganaderos, las tradiciones de la granja, y la disponibilidad de tiempo y espacio para la toma de decisiones de los ganaderos. Además, sugiere la necesidad de aumentar el conocimiento de los trabajadores de la granja y la obligatoriedad de las medidas de bioseguridad.

Tradicionalmente los estudios en salud del ganado se han centrado en métodos financieros para medir el valor de los resultados técnico-económicos de los cambios sugeridos en el manejo, siguiendo la suposición de que los ganaderos se esforzarán para conseguir el máximo beneficio; sin embargo, los ganaderos pueden ser motivados de otras maneras distintas, por ejemplo, la salud y bienestar animal, no habiendo una recomendación que sirva para todos ya que depende en gran medida de la lógica interna y del contexto real de cada granja (Kristensen & Jakobsen, 2011).

Para motivar a los ganaderos en la implementación de medidas preventivas de salud animal, es crucial entender su perspectiva en la prevención de enfermedades y

bioseguridad del establo (Brennan & Christley, 2013). En dos estudios realizados en Bélgica y Suecia mediante un cuestionario a ganaderos de porcino, de vacuno, de pequeños rumiantes y de aves, se comprobó un amplio consenso en lo que respecta a la importancia de los dos temas (Truyers *et al.*, 2011; Frössling & Nöremark, 2016), aunque estimaron que sus conocimientos en bioseguridad eran más bien escasos. En general, los ganaderos de todos los sectores indicaron que la ausencia o limitación de la implementación de medidas de bioseguridad y de prevención es probablemente debida a la falta de motivación (Truyers *et al.*, 2011) y los que creían poseer suficiente conocimiento tenían un sentido de control más alto y demandaban de los demás la adopción de medidas para prevenir la diseminación de enfermedades (Frössling & Nöremark, 2016); por lo tanto, los ganaderos deben estar motivados tanto para cambiar los comportamientos existentes como para implementar medidas efectivas para evitar fallos en la bioseguridad. La escasa información en cuanto a costes, y especialmente ingresos, es un inconveniente grande a la hora de invertir en medidas de bioseguridad (Truyers *et al.*, 2011).

El veterinario de explotación es una importante fuente de información acerca de la prevención de las enfermedades y la bioseguridad (Frössling & Nöremark, 2016; Moya *et al.*, 2019); por lo tanto, es importante que tengan los suficientes conocimientos en estos temas y sean capaces de comunicarlos a los ganaderos, especialmente cuando estos indican que recibir explicaciones por parte del veterinario aumenta substancialmente su interés por la prevención y la bioseguridad (Laanen *et al.*, 2014).

1.4.4. Implementación de un plan de bioseguridad

La implementación de planes de bioseguridad en granjas de ganado vacuno es voluntaria en casi todos los países, con excepción de las grandes explotaciones en Dinamarca, en las que medidas de bioexclusión son obligatorias (Kristensen & Jacobsen, 2011).

Las rutinas de bioseguridad a nivel de rebaño pueden reducir la introducción de enfermedades en el rebaño, pero algunas pueden considerarse caras y/o laboriosas; prácticas diseñadas a medida basadas en las características de la granja pueden ayudar a mejorar la actual aplicación de la bioseguridad en las granjas, acorde con las posibilidades económicas (Rojo *et al.*, 2016).

Para establecer un plan de bioseguridad efectivo, hay que tener en cuenta las enfermedades de mayor impacto y prevalencia de la zona dónde se encuentra la explotación, así como el riesgo de entrada en la propia granja (Callejo, 2016; Lavilla-Núñez *et al.*, 2017). Un modelo de valoración de riesgos demostró ser una herramienta útil para clarificar el riesgo de introducción de enfermedades endémicas y el efecto mitigante de las diferentes medidas de bioseguridad aplicadas en la granja (Lewerin *et al.*, 2015).

Los programas de bioseguridad deben ser monitorizados y periódicamente evaluados y actualizados, lo que ayudará a identificar oportunidades para el desarrollo de nuevos métodos de control de enfermedades infectocontagiosas o redefinir los existentes (Villarroel *et al.*, 2007).

1.4.4.1. Medidas de bioseguridad

A pesar de la reconocida importancia de la bioseguridad, diversos estudios muestran que en la práctica la adopción de medidas de bioseguridad en el vacuno de leche, así como en otros sectores ganaderos, es un tanto limitada (Sanderson *et al.*, 2000; Bottoms *et al.*, 2012; Brennan & Christley, 2012; Delgado *et al.*, 2012; Sayers *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que la gran variedad de recomendaciones publicadas puede confundir y desanimar a los ganaderos a la hora de implementar medidas de bioseguridad (Moore *et al.*, 2008; Brennan & Christley, 2012). Además, actualmente hay una falta de consenso internacional en las publicaciones respecto a los protocolos de bioseguridad (Moore *et al.*, 2008; Daly, 2011), su eficacia (Faust *et al.*, 2001; Van Winden *et al.*, 2005) y la relación coste-efectividad (Can & Altug, 2014). Estas barreras pueden ser la causa de la lenta adopción de las citadas medidas por parte de muchos ganaderos (Gunn *et al.*, 2008; Heffernan *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2008).

Las prácticas de bioseguridad pueden variar entre países, y dentro de ellos, por razones de diferencia en los tipos de producción, enfermedades presentes, legislación de control de enfermedades y medios disponibles. Por ejemplo, el modelo suizo para mantener una cabaña ganadera libre de enfermedad está mayoritariamente regulado por medidas de control gubernamentales con la vacunación obligatoria de lengua azul en 2008-2010 y el programa de erradicación de la BVD como ejemplos notables (Willgert *et al.*, 2011; Presi *et al.*, 2011). En contraste, la implementación de medidas de bioseguridad a nivel de granja es relativamente pobre en Suiza (Kuster *et al.*, 2015).

Las principales medidas de bioseguridad a implementar en las explotaciones bovinas lecheras recomendadas en Webs mundiales de organizaciones nacionales, servicios de administraciones competentes en la materia y servicios universitarios se reflejan en la tabla 2 (Moore *et al.*, 2008).

Lavado de botas o botas disponibles	Programa de control de vectores (D/D/D)
Lavado de manos o uso de guantes	Disponer de equipo y material de desinfección
Uso de ropa limpia y/o de protección	Adecuado manejo del estiércol
Formación del personal	Mantenimiento de registros sanitarios
Restricciones de movimientos en áreas de estabulación	Mantener el rebaño "cerrado"
Vehículos de particulares lejos de animales	Limitar incorporaciones de animales, cuarentena y análisis de los mismos
Control en el acceso de visitas	Manejo adecuado de cada lote de animales
Valla perimetral y puertas cerradas	Programa de vacunación adecuado
Desinfección y control de vehículos	Fomentar el conocimiento y la notificación de enfermedades

Tabla 2. Principales medidas de bioseguridad en granjas de ganado vacuno lechero.

Las medidas preventivas, como el aislamiento de los animales comprados e incorporados a la explotación, están bien documentadas en la literatura (Duncan, 1990; Maunsell & Donovan, 2008; Nöremark *et al.*, 2009) y la bioseguridad ha sido resaltada como fundamental para determinadas enfermedades del ganado vacuno en Reino Unido (Scott, 2013); sin embargo, en otros estudios no hay evidencia de medidas que estén siendo adoptadas por los productores (Nerlich & Wright, 2006; Brennan & Christley, 2013)

A continuación, se reflejan los resultados obtenidos en distintos estudios sobre la aplicación de medidas de bioseguridad en explotaciones bovinas:

Estudio en Suecia (Nöremark et al., 2010):

- Se encontraron diferencias en las rutinas de bioseguridad entre ganaderos con especies animales diferentes y distintos tamaños de rebaño.
- Se indicaron diferencias en las rutinas de bioseguridad aplicadas por diferentes categorías de profesionales que visitan sus explotaciones (transportistas, veterinarios e inspectores)
- Existieron diferentes requerimientos de bioseguridad según el tipo de visitante. Además, otros no consideran la bioseguridad necesaria a no ser en caso de brotes de enfermedades exóticas en su país.
- Algunos profesionales que visitan explotaciones adaptan sus rutinas a las exigencias del ganadero y la misma persona puede aplicar diferentes rutinas en distintas explotaciones.

Estudio en Reino Unido (Brennan & Christley 2012):

- Se encontraron grandes diferencias entre ganaderías en cuanto al tipo y grado de bioseguridad aplicado.
- La mayoría de los granjeros no aislaba el ganado comprado, pero una pequeña proporción siempre lo hacía.
- Muchos ganaderos aplicaban tratamientos tras el movimiento de animales, fundamentalmente vacunaciones y antihelmínticos, pero muy pocas granjas manifestaron hacer chequeos de control después de incorporar los animales.
- Hubo mucha variación en el nivel de bioseguridad adoptada por las personas que visitaban las granjas; así, los transportistas encargados de la recogida de cadáveres o de repartir las deyecciones, aunque se supone que tienen contacto potencial con agentes infecciosos, raramente desinfectaban los vehículos y a ellos mismos.

Estudio en Inglaterra (Shortall, 2017):

- Mantener un rebaño cerrado fue valorado como la medida más efectiva, y el contacto regular con el veterinario, la más práctica.
- Las medidas relativas al conocimiento, planificación e implicación del veterinario, así como las prácticas de compra, cuarentena y tratamiento obtuvieron una valoración más alta en cuanto a efectividad.
- Las medidas relativas al contacto directo entre animales se valoraron mucho más, en cuanto a efectividad, que las medidas relacionadas con la transmisión indirecta.
- Algunas de las medidas más efectivas también fueron consideradas de difícil aplicación práctica, como por ejemplo mantener el rebaño cerrado o evitar el contacto nariz-nariz entre animales contiguos.

Por último, hay que indicar que existe un vacío en la responsabilidad a la hora de aplicar medidas de bioseguridad que debe ser aclarado; los visitantes necesitan responsabilizarse para evitar la expansión de enfermedades mientras que los ganaderos deben asumir la responsabilidad de proveer las condiciones adecuadas para su aplicación (Callejo, 2016).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron fundamentalmente tres:

- En primer lugar, evaluar y caracterizar la aplicación actual de medidas de bioseguridad en explotaciones bovinas lecheras en dos comunidades autónomas, Cataluña y Galicia. Dado que la valoración de muchas prácticas clave de bioseguridad se relaciona con IBR y BVD, y dado que estas enfermedades son endémicas en la mayoría de los países con ausencia de programas de control y/o erradicación, se analizó el estado sanitario de las granjas en relación con ambas enfermedades.
- En segundo lugar, se trató de identificar posibles asociaciones entre las pautas de manejo y el estado sanitario de los rebaños de ganado vacuno lechero de Galicia en relación a la paratuberculosis, utilizando para valorar dicho estatus la prueba ELISA de detección de anticuerpos en suero y la PCR en heces.
- En tercer lugar, realizar un análisis semicuantitativo de los factores de riesgo relacionados con la entrada de MAP en las explotaciones de ganado vacuno de leche gallegas basándonos en las opiniones de un grupo de expertos del sector (veterinarios especialistas en distintas ramas del sector bovino).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA Y REBAÑOS ENCUESTADOS

Este estudio se llevó a cabo en Galicia, NW de España, y Cataluña, NE de España. Galicia es la principal área de ganado vacuno del país con el 55% de las ganaderías y el 38% de la producción de leche del país. El tamaño medio de explotación es 43 vacas, siendo más bajo que el nacional, con 59,3 de media. Las granjas son predominantemente familiares. En Galicia se lleva a cabo un programa de control oficial de IBR, BVD y paratuberculosis de carácter voluntario desde 2004 (ADSGs). Esta región es representativa del modelo de explotación del noroeste y región cantábrica de España. Por contra, las explotaciones catalanas tienen una media de tamaño de rebaño de 144 vacas, con el 4% del total de granjas a nivel nacional y el 11% de la producción de leche. En esta región no hay establecido ningún programa de control oficial de enfermedades endémicas.

Se seleccionaron 124 granjas de leche, 93 de Galicia y 31 de Cataluña, como parte de un proyecto nacional de análisis de riesgo de introducción de BVDV, BoHV-1 y MAP en las ganaderías de leche. Representaban el 1,3% y 5,7% de las granjas de Galicia y Cataluña respectivamente. Para la selección de granjas, el proyecto fue presentado a los veterinarios responsables de la sanidad del ganado en las diferentes áreas de ambas regiones. Durante las visitas de rutina, los veterinarios involucrados, explicaron a los ganaderos el proyecto en cuestión.

Aquellos ganaderos interesados en participar en el estudio lo hicieron voluntariamente, pues el mismo no estaba incentivado económicamente o por otra vía. Así, la selección de granjas se basó en la disposición de los veterinarios y ganaderos para participar una vez conocidas las implicaciones del estudio.

3.2. CUESTIONARIO DE BIOSEGURIDAD Y GRUPO DE EXPERTOS

Los datos de bioseguridad se obtuvieron a través de un cuestionario. Este se diseñó basándose en la literatura existente (Brennan *et al.*, 2012; Sarrazin *et al.*, 2014) y en discusiones con investigadores y veterinarios de la Universidad de Santiago de Compostela y la Universidad Autónoma de Barcelona, veterinarios de los gobiernos regionales y veterinarios de campo especialistas en distintas materias de ambas comunidades autónomas.

El cuestionario consistía en distintas preguntas incluidas en cuatro secciones: 1) información general de la granja (localización, tamaño, programas de vacunación); 2) movimientos de animales (origen y frecuencia de nuevas incorporaciones, analíticas realizadas a las mismas, instalaciones de cuarentena, recría externa, asistencia a ferias y concursos, salida a pastos) y vecindario (otras granjas en el radio de 1 km); 3) movimientos y tipos de vehículos y equipamiento (para transporte de animales vivos y cadáveres, estiércol, purín, alimentos, maquinaria y otros materiales) y medidas de bioseguridad relacionadas (los vehículos pueden entrar en el perímetro de la granja, pueden entrar vehículos con animales de otras granjas); y 4) visitantes y personal (trabajadores externos, frecuencia de visitas de profesionales

como veterinarios y técnicos, o no profesionales como ganaderos vecinos que entran en contacto con los animales, uso de ropa de protección).

En un primer momento el cuestionario se realizó en cinco granjas, tres en Cataluña y dos en Galicia, las cuales no se incluyeron en el estudio definitivo, para valorar la claridad de las preguntas y si los encuestados tenían alguna sugerencia de mejora. Como resultado de esta prueba se llevaron a cabo pequeñas modificaciones en el cuestionario.

En las granjas incluidas en el estudio el cuestionario fue llevado a cabo por un investigador de la Universidad de Santiago de Compostela (Galicia) o de la Universidad Autónoma de Barcelona (Cataluña), durante entrevistas en profundidad con los ganaderos y los veterinarios responsables de la sanidad en cada granja. Las citas para las entrevistas se marcaban de acuerdo con la agenda de los participantes, asegurando la presencia del veterinario, conocedor del manejo y las medidas de bioseguridad de cada granja, y concertando la cita para la visita a la misma y así mejorar la precisión de los datos recogidos. Además, se subrayó a los ganaderos que el cuestionario se procesaría de forma anónima. Cada ganadería se visitó una vez entre julio de 2017 y abril de 2018. El tiempo aproximado para completar el cuestionario y la visita a la granja rondó las 2,5 horas.

Para el caso particular de la paratuberculosis bovina, los potenciales factores de riesgo asociados con la introducción de MAP en los rebaños lecheros se seleccionaron basándose en la revisión bibliográfica (Vilar, 2015; Wolf *et al.*, 2016; McAloon *et al.*, 2017) y se incluyeron en esta parte del estudio las 93 granjas de Galicia previamente mencionadas.

Además, para cada factor considerado en el cuestionario se desarrolló un árbol de decisión y se incluyeron preguntas clave en cada uno de ellos. Las respuestas a estas preguntas clave llevaban a diferentes eventos dentro del árbol de decisiones. La Figura 13 muestra el árbol de decisiones para la compra de animales. Por ejemplo, el evento E3 en la Figura 13 corresponde a un rebaño que compró ganado durante los dos años anteriores, el estado sanitario de la granja o granjas de origen era negativo y el número medio de animales comprado fue $\geq 3/\text{año}$. Los restantes árboles de decisión se incluyen como Anexo 1.

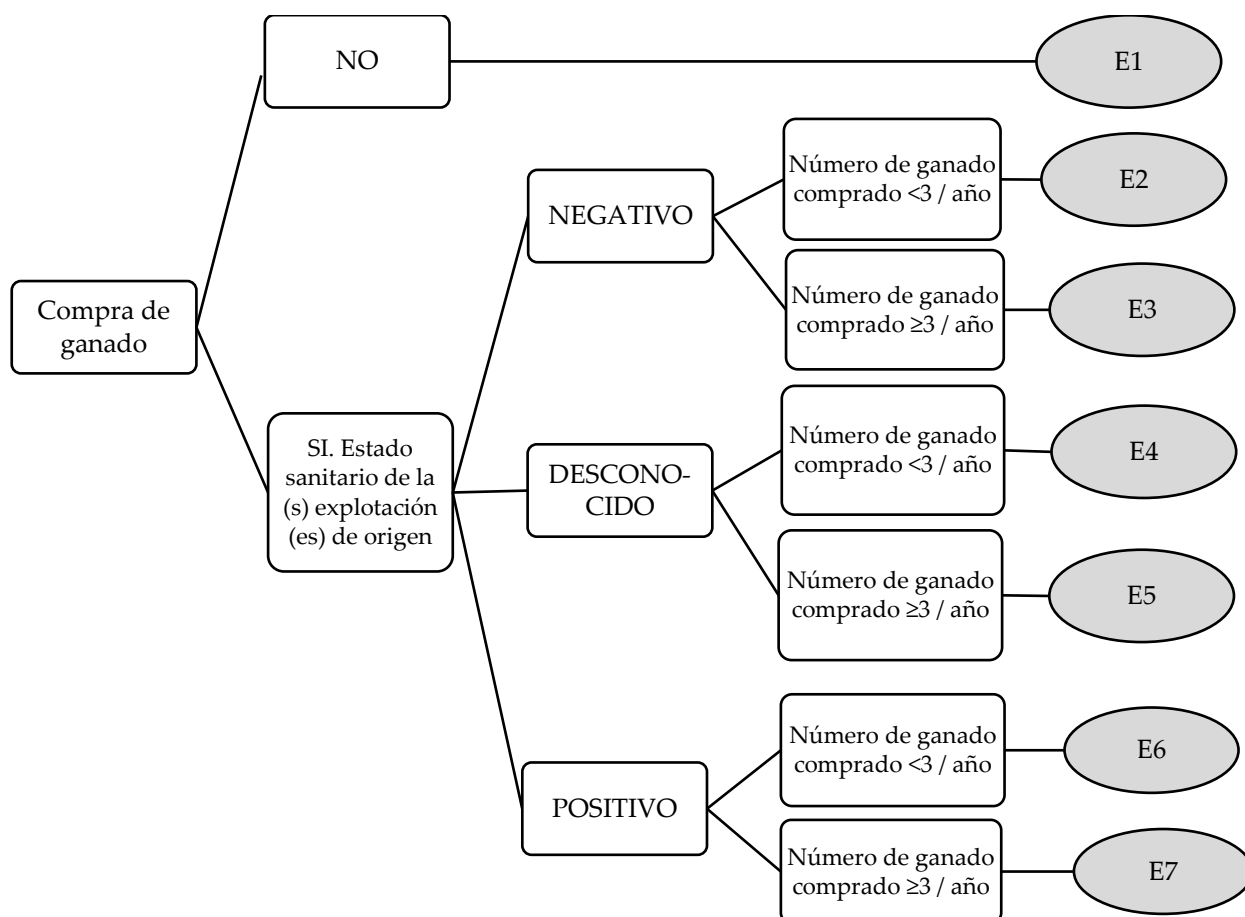


Figura 13. Árbol de decisión de compra de ganado.

Una vez elaborados los árboles de decisión se convocó a un panel de expertos para valorar los riesgos potenciales. Nueve veterinarios de diferentes subespecialidades (personal de laboratorio a cargo del procesamiento de muestras del programa de control de MAP, veterinarios a cargo de los programas de control de MAP, investigadores especialistas en epidemiología y enfermedades infecciosas del ganado, veterinarios de asociaciones de ganado y veterinarios de laboratorios farmacéuticos) fueron seleccionados en base a su experiencia, proximidad y conocimiento de la enfermedad. La información sobre los antecedentes de los participantes se proporciona como Tabla 3.

	Puesto. Institución	Experiencia
1	Jefe del servicio de biología molecular. Laboratorio de producción y sanidad animal (Xunta de Galicia).	Alrededor de 28 años trabajando en serología y biología molecular de enfermedades infecciosas del ganado.
2	Veterinario jefe. Grupo de Defensa Sanitaria de Galicia.	Responsable programa de control de MAP en 4 municipios de Galicia durante los últimos 12 años. Previamente 15 años de experiencia como veterinario clínico.
3	Veterinario jefe. Grupo de Defensa Sanitaria de Galicia.	Responsable programa de control de MAP en 5 municipios de Galicia durante los últimos 15 años.
4	Profesor e investigador en salud animal de la Facultad de Veterinaria - Universidad de Zaragoza.	Alrededor de 30 años trabajando en enfermedades infecciosas de rumiantes, principalmente con análisis de riesgo y modelos de transmisión
5	Profesor e investigador en Salud animal de la Facultad de Veterinaria - Universidad Autónoma de Barcelona.	Alrededor de 20 años trabajando en enfermedades infecciosas del ganado principalmente con análisis espacial de riesgo.
6	Profesor e investigador en salud animal de la Facultad de Veterinaria - Universidad de Santiago de Compostela.	Alrededor de 35 años trabajando en enfermedades infecciosas del ganado principalmente con técnicas de diagnóstico y modelos de transmisión.
7	Responsable del Programa de Mejora del Rebaño Lechero en Galicia.	Alrededor de 33 años de experiencia con ganado lechero. Ha trabajado como veterinario clínico, nutricionista, jefe de una cooperativa agraria y durante los últimos 23 años como responsable del Programa de mejora del Rebaño Lechero en Galicia.
8	Técnico de campo ganadero. Laboratorio farmacéutico.	Alrededor de 19 años de experiencia con ganado lechero. Veterinario clínico y los últimos 5 años como técnico de campo de ganado lechero en un laboratorio farmacéutico.
9	Veterinario clínico libre.	Alrededor de 9 años de experiencia como veterinario clínico de ganado lechero.

Tabla 3. Antecedentes y experiencia de los diferentes expertos que participaron en un panel de expertos sobre paratuberculosis bovina.

Posteriormente, se enviaron los árboles de decisión a cada veterinario, junto con las explicaciones oportunas de la metodología. De esta forma, a cada evento de cada árbol debía asignarle una puntuación (en una escala ordinal de 0 a 9) en función del riesgo que, en su opinión, cada uno de estos eventos pudiera suponer para la entrada de la enfermedad en los rebaños lecheros (Dufour *et al.*, 2011). El panel de expertos se celebró en diciembre de 2019 en la Facultad de Veterinaria de Lugo (España). Durante el mismo se discutieron y resolvieron dudas y posibles malentendidos. Además, se presentaron los histogramas que muestran las puntuaciones asignadas por los participantes. Estos histogramas se discutieron entre todos y los participantes tuvieron la oportunidad de cambiar las puntuaciones asignadas si consideraban que habían sobrestimado o subestimado alguno de los eventos.

3.3. ESTATUS SANITARIO

En las granjas de Galicia y Cataluña el estado sanitario de BVDV y BoHV-1 se determinó mediante ELISA de anticuerpos siguiendo las directrices del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (DOGA, 2017), y teniendo en cuenta que las granjas que aplicaron vacunas utilizaron vacunas inactivadas en el caso del BVDV y vacunas marcadoras (vivas o inactivadas) en el caso de BoHV-1. Los veterinarios responsables de cada granja involucrada en el proyecto recogieron muestras dentro de los tres meses posteriores a la finalización del cuestionario. Para el BVDV, se determinaron anticuerpos contra el antígeno p80 usando un ELISA comercial de bloqueo (BVD p80 Ab, IDEXX Laboratories, Países Bajos). En los animales vacunados con vacunas inactivadas, los anticuerpos reaccionan principalmente con proteínas estructurales en lugar del antígeno p80 (no estructural) (Bolin & Ridpath, 1990). Esto permitió la diferenciación entre los animales expuestos al BVDV de campo y el virus de la vacuna, ya que no se utilizaron vacunas vivas en los rebaños aquí examinados.

Para el caso del BoHV-1, se utilizaron dos pruebas diferentes dependiendo de si en el rebaño se usaban vacunas (anticuerpo Idexx IBR gE, IDEXX Laboratories; Países Bajos) o no (Idexx IBR gB anticuerpo, IDEXX Laboratories; Países Bajos). Todos los análisis se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con los resultados de estas pruebas, se establecieron tres perfiles de rebaño diferentes para cada uno de los dos virus: (1) granjas con infección reciente o activa (seropositividad en novillas de 9 a 24 meses nacidas en la granja), (2) granjas con animales adultos seropositivos pero todas las novillas de cría (9-24 meses) seronegativas, o (3) granjas libres (todos los animales resultaron seronegativos).

Las 93 granjas encuestadas en Galicia se analizaron también frente a MAP. Siguiendo el programa sanitario de ADSGs, se tomaba una muestra de sangre anual a animales de más de 24 meses de edad. Los sueros eran analizados para determinar anticuerpos anti-MAP con un test comercial de ELISA (Paratuberculosis Screening Ab; IDEXX, Westbrook, ME, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A todos los animales positivos a esta prueba se les tomaban muestras de heces que fueron analizadas mediante PCR (ID Gene Paratuberculosis Duplex, ID. Vet, Grabels, France). La sensibilidad y especificidad estimada del test ELISA es de 34% y 96% respectivamente (Aly *et al.*, 2014).

Para esta enfermedad, los rebaños fueron clasificados como positivos o negativos en función de los resultados laboratoriales obtenidos durante los dos muestreos anuales llevados a cabo antes de la realización del cuestionario. Los rebaños sin animales positivos en ambos muestreos se clasificaron como negativos. Aquellos rebaños con animales confirmados en heces o con prevalencias iguales o superiores al 15% en cualquiera de los muestreos anuales, aún sin confirmación en heces, se consideraron positivos. Los rebaños restantes, tenían seropositividad $\leq 15\%$ sin confirmación de la bacteria, o eran rebaños seronegativos pero con un solo muestreo anual (ya que se habían incorporado recientemente al programa). Para evitar errores en la clasificación, estos no se tuvieron en cuenta en los análisis.

El tiempo transcurrido entre la última muestra, de las dos consideradas, y la realización de la encuesta varió entre granjas, oscilando entre uno y cuatro meses.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con SPSS 15.0. Inicialmente se analizaron las frecuencias de los diferentes perfiles de BoHV-1, BVDV y MAP y las medidas de bioseguridad.

Se realizó un análisis de correspondencias múltiple (MCA por sus siglas en inglés) para caracterizar la aplicación actual de medidas de bioseguridad en explotaciones de ganado lechero de dos comunidades Autónomas en España (Galicia y Cataluña) y el estado sanitario frente a BVDV y BoHV-1. El MCA tiene como objetivo reducir un conjunto de variables posiblemente correlacionadas (incluidas todas las variables de bioseguridad y estado sanitario de las granjas) a un grupo más pequeño de dimensiones linealmente no correlacionadas. Se estableció el número de dimensiones en dos, para facilitar la representación gráfica bidimensional. La posición del conjunto completo de categorías para cada variable investigada (puntos de categoría) en el gráfico MCA es la base para revelar las relaciones entre las variables: las categorías de variables con un perfil similar tienden a agruparse, mientras que las categorías correlacionadas negativamente se ubican en lados opuestos de la gráfica. Además, se realizó un *análisis de conglomerados de dos pasos* (TSCA, siglas en inglés) para identificar conglomerados de ganaderos con niveles de bioseguridad y perfiles de BVDV y BoHV-1 similares. Para estos análisis (MCA y TSCA), las frecuencias de entrada de animales, vehículos y visitas (recogidas en el cuestionario como valores numéricos) se procesaron como variables categóricas (4 categorías basadas en los cuartiles) pero se incluyeron en las tablas de resultados finales como media y mediana de las frecuencias de entrada.

En Galicia, por lo que respecta a las prácticas de riesgo en relación con la paratuberculosis, los factores de riesgo candidatos fueron evaluados para determinar su asociación con el estado de infección frente a MAP mediante la prueba χ^2 o el test exacto de Fischer usando tablas k x 2. Todos los factores con moderada significación estadística ($P < 0,25$) en estos análisis se incorporaron a un modelo logístico múltiple (prueba de Wald con valor P de 0.05 para entrar en el modelo). El tamaño del rebaño también se incluyó en el modelo como posible factor de confusión (Puerto-Parada *et al.*, 2018); si esta variable cambiaba el efecto de los coeficientes restantes en un 10% o más, se consideraba un factor de confusión y se mantenía en el modelo, independientemente de su nivel de significación (Domenech, 2004). Las variables utilizadas en el análisis de regresión se eligieron tras un análisis de correlación [utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (ρ)] para evitar la multicolinealidad. Además, la validez del modelo logístico se comprobó utilizando los tests R^2 de Cox y Snell y el R^2 de Nagelkerke (Walker & Smith, 2016).

Finalmente, en relación a los resultados obtenidos a través del panel de expertos, se calcularon las medias de puntuaciones (junto con la mediana, máxima y mínima) asignadas por los veterinarios a cada evento en el árbol de decisiones.

A partir de estos valores medios, y usando los datos recogidos en las 93 encuestas realizadas, se registró la puntuación que cada granja obtendría para cada árbol de decisión. Por ejemplo, en el caso de un rebaño que hubiera comprado 3 o más animales al año en rebaños negativos (evento 3) se registraría la media de las puntuaciones asignadas por los veterinarios para esa granja. Sumando las

puntuaciones obtenidas por cada granja en todos los árboles de decisión, se asignaba una puntuación global a cada granja.

Las puntuaciones de las granjas clasificadas como positivas y negativas en base a los análisis de laboratorio se compararon usando ANOVA.

Además, a partir de las puntuaciones globales (variable de contraste), y utilizando una curva ROC, se estimó el punto de corte que mejor discriminaba las explotaciones positivas y negativas.

Igualmente, para cada granja positiva, se proporcionaron los dos eventos de mayor puntuación registrados en esa granja según la opinión de los expertos.

4. RESULTADOS

Los perfiles de BVDV y BoHV-1 de las 124 granjas se resumen en la tabla 4.

	BVDV	BoHV-1
Infección activa/reciente	44 (36,1)	13 (10,7)
Seropositividad (pero recria libre)	24 (19,7)	48 (39,3)
Rebaño libre	56 (44,3)	63 (50,0)

Tabla 4. Estado sanitario frente a BVDV y BHV-1 en 124 granjas en España.

La categoría de granja serológicamente libre representó una proporción del total similar para ambos virus (50% y 44,3% para BoHV-1 y BVDV, respectivamente). Sin embargo, la proporción de granjas clasificadas como infección reciente/activa fue mucho mayor para el BVDV (36,1% frente al 10,7%). Treinta y siete de 124 granjas usaron vacunas inactivadas contra el BVDV, mientras que el resto no se vacunó; 33 utilizaron vacunas marcadoras para BoHV-1, mientras que el resto no vacunó.

La Tabla 5 describe las medidas de bioseguridad relacionadas con los movimientos de animales y el posible contacto con otros rumiantes domésticos.

	Nº (%)
Compra de animales (vacas/novillas)	
No	78 (62,9)
Sí (estatus sanitario granja de origen conocido)	18 (14,5)
Sí (estatus sanitario granja origen desconocido)	17 (13,7)
Sí (sin analizar)	11 (8,9)
Media (mediana; Q1-Q3*) frecuencia de compra de novillas o vacas por año, cuando proceda (46 granjas)	5,25 (3; 2-6)
Transporte de vacas y novillas compradas	
No hay contacto con otros rumiantes durante el transporte	39 (84,8)
Puede haber contacto con otros rumiantes	7 (15,2)
No procede	78
Instalaciones de cuarentena adecuadas †	
Sí	4 (3,2)
No	120 (96,8)
Recría externa ‡	
No	112 (90,2)
Sí	12 (9,8)
Plan sanitario en las granjas de recría externa §	
Sí	6 (50)
No	6 (50)
Transplante de embriones	
No	118 (95,2)
Sí (estatus sanitario de la donante conocido)	6 (4,8)
Sí (estatus sanitario de la donante desconocido)	0 (0)
Granjas de vacuno en un radio de 1 km.	
No	16 (12,9)
Sí	108 (87,1)
Granjas de ovejas/cabras en un radio de 1 km.	
No	81 (92,6)
Sí	43 (34,7)
Ovejas/cabras en la granja	
No	113 (92,6)
Sí	11 (7,4)
Participación en ferias/concursos	
No	117 (94,3)
Sí (sin retorno)	1 (0,8)
Sí (posible retorno)	6 (4,9)
Pasto	
No	70 (56,4)
Sí	28 (22,6)
Sí	26 (21,0)

*Q1: percentil 25; Q3. Percentil 75; †Edificios separados, fuera del perímetro de la granja y animales en cuarentena un espacio de tiempo suficiente para confirmar su estatus sanitario; ‡Recría en granjas especializadas junto con animales de otras granja; §Granjas de recría bajo programa sanitario oficial de BVD/IBR (ie, Agrupación Defensa Sanitaria del Ganado) o equivalente al oficial. BVD, diarrea vírica bovina; IBR, rinotraqueítis infecciosa bovina.

Tabla 5. Medidas de bioseguridad relacionadas con la compra de ganado, o posible contacto con otros rumiantes, para 124 granjas en España.

Para la mayoría de las granjas, el riesgo de introducción de enfermedades a través de la compra de animales (novillas o vacas) era presumiblemente bajo, ya que la mayoría criaba sus propios animales de reposición. Las explotaciones que compraron ganado (46/124, 37,1%) tuvieron una frecuencia media-baja de compras (5,2 animales comprados /año). Sin embargo, es de destacar que 11/46 (23,9%) granjas compraron animales sin ningún tipo de prueba, 39/46 granjas (84,8%) compraron ganado que podría entrar en contacto con otro ganado durante el transporte, y la mayoría de las granjas carecían de instalaciones adecuadas de cuarentena.

El movimiento de animales a ferias o concursos de ganado fue una posible vía de transmisión de enfermedades solo para 7/124 granjas (5,7%), pero es de destacar que casi todas las granjas informaron que los animales que retornaban a la granja lo hacían sin ninguna cuarentena. La transferencia de embriones solo se realizaba en 6/124 granjas y siempre se conocía el estado sanitario de las donantes. La salida a pastos fue mucho más frecuente: 54/124 granjas (43,6%) utilizaban esta práctica, y la mitad de estas reconocieron la posibilidad de contacto con otros rumiantes domésticos en el pasto. Además, la mayoría de las granjas tenían otras granjas de ganado vacuno u ovino/caprino en un radio de 1 km.

Los vehículos que visitaban las granjas representaron un riesgo de infección para la mayoría de las explotaciones, porque casi todos los vehículos entraban dentro del perímetro de todas las granjas (tabla 6).

	Nº (%)
Carro de alimentación compartido	
No	48 (38,7)
Sí	76 (61,3)
Media (mediana; Q1-Q3*) número de entradas del carro de alimentación a la semana, cuando se comparte	7,1 (7; 7-7)
Maquinaria compartida (tractores, remolques, cisternas, removedor de purín, empacadoras y otros)	
No	60 (47,5)
Sí	64 (52,5)
Vehículo de estiércol compartido	
No	103 (80,1)
Sí	21 (18,9)
Media (mediana; Q1-Q3*) número de entradas del vehículo de estiércol al mes, cuando es compartido	0,39 (0,17; 0,12-0,54)
Material compartido (crotaladora, material para partos, material de limpieza, material para cosecha y otros)	
No	100 (80,3)
Sí	24 (19,7)
Vehículo de purín compartido	
No	82 (66,2)
Sí	42 (33,8)
Media (mediana, Q1-Q3*) del vehículo de purín al mes, cuando es compartido	0,33 (0,08; 0,08-0,60)
Zona de depósito de cadáveres	
Fuera del perímetro de la granja	27 (20,5)
Dentro del perímetro de la granja	97 (79,5)
Media (mediana; Q1-Q3*) número de entradas del vehículo de recogida de cadáveres al mes (cuando proceda)	0,34 (0,17; 0,12-0,51)
Vehículo (matadero/cebo) puede llegar con animales de otras granjas	
No	5 (3,3)
Desconocido	5 (4,1)
Sí	114 (92,6)
Vehículo (matadero/cebo) puede entrar dentro del perímetro de la granja	
No	6 (4,9)
Sí	118 (95,1)
Media (mediana; Q1-Q3*) de entradas del camión de transporte a matadero/cebo dentro del perímetro de la granja/mes	2,6 (2; 1,5-5,3)

*Q1: percentil 25; Q3: percentil 75.

Tabla 6. Medidas de bioseguridad relacionadas con vehículos y equipos en 124 granjas de España.

Los vehículos que entraban con mayor frecuencia eran los carros de alimentación, seguidos por los que recogen animales vivos (para sacrificio o terneros para cebo). Además, en la mayoría de las granjas (92,6%), los vehículos de las dos últimas categorías podían llegar con animales de otros establos. Varias granjas compartían maquinaria u otros vehículos, como vehículos para estiércol o purines, con otras.

El control de las visitas y personal también mostraba margen de mejora (Tabla 7).

	Nº (%)
Empleados externos	
No	68 (55,7)
Sí, pero no trabajan en otras granjas	44 (34,4)
Sí, y trabajan en otras granjas	12 (9,8)
Valla perimetral	
Sí, permanece siempre cerrada	5 (4,1)
Sí, no siempre cerrada	8 (6,6)
No	111 (89,3)
Aparcamiento para vehículos de visitantes	
Fuera del perímetro de la granja	4 (3,3)
Dentro del perímetro de la granja	120 (96,7)
Media (mediana; Q1-Q3*) de visitantes/mes que pueden entrar en contacto con los animales	7,2 (5; 3-9)
Los visitantes siempre usan ropa de protección †	
Sí	9 (7,4)
No	115 (92,6)

*Q1: percentil 25; Q3: percentil 75; †Fundas o mandilones y botas proveídas por el ganadero antes de entrar en el área del ganado.

Tabla 7. Medidas de bioseguridad relacionadas con los visitantes y el personal en 124 fincas en España.

La mayoría de las granjas no tenían cercas perimetrales (89,3%) y el estacionamiento de vehículos de visitantes generalmente estaba dentro del perímetro de la granja (96,7%). Frecuentemente podían recibir visitantes que, sin ropa protectora, tenían contacto con los animales (92,6%).

El MCA con datos estandarizados explicó el 38,9% de la varianza en bioseguridad y estado sanitario (frente a IBR y BVD) entre las 124 granjas de Galicia y Cataluña. El porcentaje de varianza explicado por la primera dimensión fue del 24,7% y para la segunda dimensión fue del 14,2%.

Los principales resultados de la MCA se presentan en la Figura 14.



Figura 14. Diagrama conjunto MCA de los puntos de categorías para las diferentes pautas de bioseguridad y los perfiles de BVDV/BoHV-1 resultantes del MCA. Las frecuencias de compra de ganado y entrada de vehículos y visitantes, cada una con cuatro categorías basadas en los cuartiles de estas frecuencias, no se muestran. BoHV-1, herpesvirus bovino 1; BVDV, virus de la diarrea vírica bovina; MCA, análisis de correspondencia múltiple.

Las puntuaciones obtenidas de la MCA, junto con las soluciones de la TSCA, se presentan en la Figura 15.

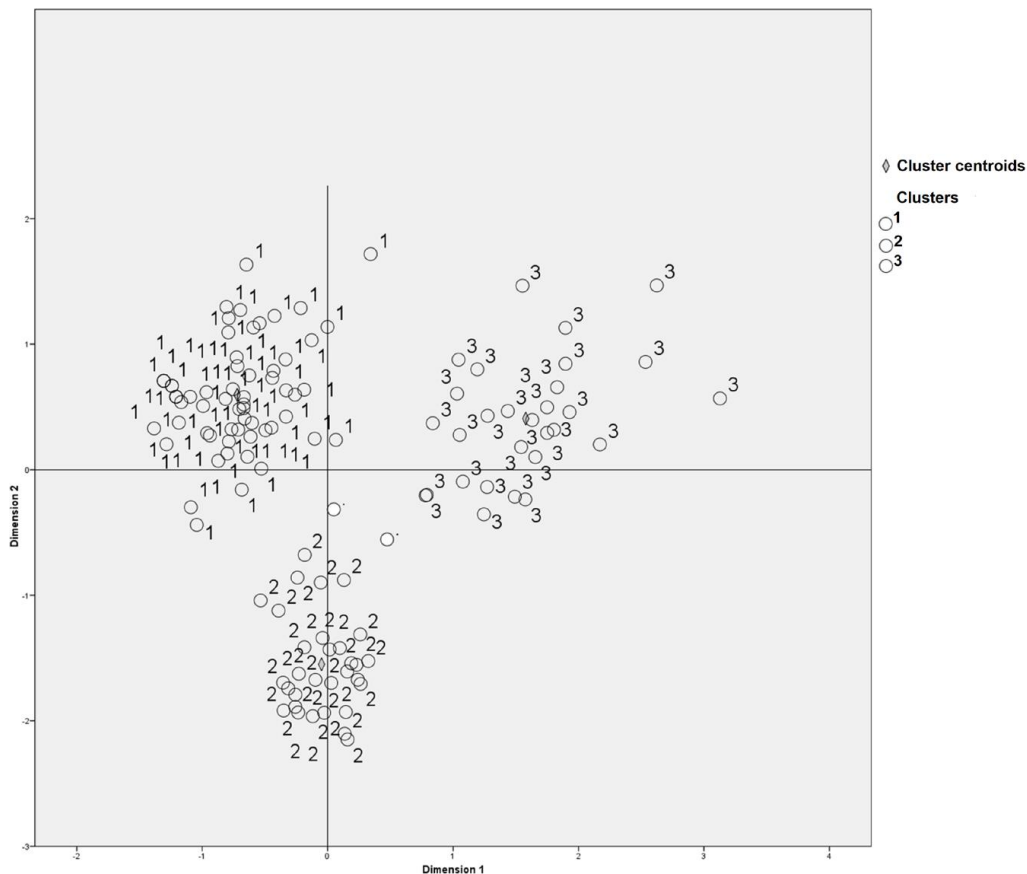


Figura 15. Conglomerado de granjas y su localización en el análisis de correspondencias múltiples. Análisis de conglomerado de dos pasos identificando los tres conglomerados principales incluyendo 122 de las 124 granjas del estudio; las dos restantes se muestran en blanco en el centro del gráfico.

De acuerdo al TSCA había tres perfiles principales de granjas que incluyeron 122 de los 124 rebaños. La tabla *porcentajes dentro del conglomerado* muestra cómo se divide cada categoría sanitaria o variable de bioseguridad dentro de cada conglomerado (Anexo 2).

El conglomerado 1 ($n = 62$) comprendía rebaños ubicados principalmente en el cuadrante superior izquierdo del gráfico MCA. Todos estos rebaños eran de Galicia, con un tamaño medio reducido (51 vacas) y con frecuencia libres de BVDV y BoHV-1.

Estas granjas verificaban el estado sanitario de los animales comprados, en la granja de origen o en la propia, una vez llegados. Sin embargo, no contaban con instalaciones de cuarentena adecuadas. Este conglomerado fue el que más usó granjas de cría externa. El pastoreo se observó con más frecuencia que en los otros conglomerados (incluido el posible contacto entre el ganado de la granja y los rumiantes de otras granjas). Además, estos rebaños estaban ubicados en áreas de alta densidad ganadera, la mayoría ubicadas a 1 km o menos de otras granjas ganaderas. Este conglomerado también fue el que más frecuentemente compartía maquinaria y materiales con otras granjas.

La presencia de trabajadores externos en estas granjas era muy escasa. Carecían, en su mayoría, de estructuras como cercas perimetrales o estacionamientos exteriores y, curiosamente, recibieron numerosos visitantes a pesar de su pequeño tamaño. Aunque el uso de ropa protectora adecuada se reveló como deficiente en toda la muestra de explotaciones, fue especialmente inadecuado en este conglomerado.

El conglomerado 2 (n = 31) incluía rebaños también de Galicia, a menudo de tamaño intermedio (media de 63 vacas). Desde el punto de vista sanitario, se observó con mayor frecuencia seropositividad frente a BoHV-1 o BVDV sin evidencia de infección reciente o activa.

Estas granjas compraban animales con menos frecuencia que las de otros conglomerados. Cuando lo hacían, las compras implicaban a menudo pocos animales, que se analizaban frente a BVDV y BoHV-1. Este fue también el conglomerado con mayor control sobre el transporte de compra de animales, evitando el contacto con otros animales durante el transporte. Como en el conglomerado anterior, estas granjas estaban ubicadas en áreas de alta densidad de ganado, y la mayoría también tenía otras granjas de pequeños rumiantes en un radio de 1 km.

El carro de alimentación se compartía con mucha frecuencia, siendo un vehículo que entraba en los establos diariamente (esta particularidad también se presentó en el conglomerado 1, aunque en menor proporción). Estructuras como cercas perimetrales o estacionamientos exteriores para visitantes también eran escasos en las granjas del conglomerado 2. El número de trabajadores externos era intermedio entre los de los grupos 1 y 3. El uso de ropa de protección adecuada todavía era escaso.

El grupo 3 (n = 29) comprendía todos los rebaños de Cataluña, con los rebaños más grandes (media de 122 vacas). Este conglomerado tuvo las proporciones más altas de infecciones activas / recientes con BVDV y BoHV-1.

La compra de animales de reposición era más común, y la cantidad de animales comprados era generalmente alta. En particular, las 11 granjas que compraron animales sin ninguna prueba sanitaria se incluían en este conglomerado. Aunque poco frecuente, también era el grupo con mayor frecuencia de participación en ferias o concursos de ganado. Las granjas de este grupo compartían maquinaria o materiales con menos frecuencia que las granjas más pequeñas de los grupos 1 y 2, a excepción de los vehículos de estiércol.

Las estructuras como vallas perimetrales o estacionamientos exteriores para visitantes eran escasas, pero, no obstante, más frecuentes que en los otros conglomerados. Todas las granjas del grupo 3 emplearon trabajadores externos que a menudo trabajaban también en otras granjas. El uso de ropa protectora por parte de los visitantes fue algo más común en este conglomerado.

En relación a la paratuberculosis bovina, se analizó únicamente en los 93 rebaños de Galicia. De ellos, 67 se clasificaron como negativos y dieciséis como positivos. Los 10 restantes no se incluyeron en el análisis por el motivo ya explicado.

Los factores de riesgo potenciales cuyas asociaciones con el estado de infección frente a MAP tuvieron valores $p \leq 0,25$ fueron: frecuencia promedio de ganado comprado por año y estado sanitario de la granja de origen ($p = 0,016$), camión de

estiércol compartido ($p = 0,049$), materiales compartidos ($p = 0,019$), vehículos que transportan animales vivos, al matadero o para cebo, y pueden traer animales de otras granjas ($p = 0,123$), empleados externos ($p = 0,247$) y visitas por mes que pueden entrar en contacto con los animales ($p = 0,037$).

Los coeficientes de correlación entre las variables consideradas para el análisis multivariable indicaron una correlación que va de insignificante a moderada. Los valores más altos se observaron entre el tamaño del rebaño y los visitantes por mes que entraron en contacto con los animales (0,574), tamaño del rebaño y empleados externos (0,381), y vehículo de estiércol compartido y el camión de transporte de animales (matadero o engorde) que puede venir con otros animales (0,317). Las restantes comparativas tienen valores inferiores a 0,3.

El análisis de regresión indicó que el tamaño del rebaño y las prácticas de compra fueron los mejores predictores del estado sanitario frente a MAP (Tabla 16). Granjas que compraron ganado a otras con estado sanitario desconocido frente a MAP y con una frecuencia promedio anual superior a 3 (es decir, mayor que la frecuencia mediana de entradas para granjas que compran animales) así como rebaños con más de 117 vacas (percentil 90 de la distribución del tamaño del rebaño) tenían mayor riesgo. Los valores de R^2 de Cox y Snell y R^2 de Nagelkerke del modelo final fueron 0,218 y 0,348, respectivamente.

Variables	B	P	Exp (B)	95% CI de exp (B)
				Inferior Superior
Tamaño de rebaño				
47-117	0.069	0.923	1.071	0,263 4.361
>117	2.043	0.026	7.712	1.276 46.615
Frecuencia promedio de ganado comprado por año/Estado sanitario de la granja de origen				
1-3 negativo	- 19.335	0.999	0.000	-
1-3 positivo o desconocido	- 19.356	0.999	0.000	-
>3 negativo	- 19.387	0.999	0.000	-
>3 positivo o desconocido	1.716	0.023	5.561	1.270 24.360
Constante	12.436	0.999	0.000	

Tabla 16. Modelo de regresión logística múltiple para evaluar factores de riesgo de infección con *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* según datos obtenidos de 83 rebaños lecheros en Galicia (noroeste de España).

En relación a los datos obtenidos a través del grupo de expertos sobre paratuberculosis bovina, las puntuaciones medias, máximas y mínimas dadas por los veterinarios para cada evento en cada árbol de decisión se presentan en la tabla 17.

		Media	Mediana	Máximo	Mínimo
Compra de Ganado	E1	0	0	0	0
	E2	2	2	3	1
	E3	3.11	3	4	2
	E4	6.22	6	8	5
	E5	7.33	7	9	6
	E6	8.11	8	9	7
	E7	8.89	9	9	8
Participación en ferias o concursos de ganado	E1	0	0	0	0
	E2	3.44	3	5	1
	E3	5.22	5	7	4
	E4	7	7	9	5
Ovejas / cabras en la granja	E1	0	0	0	0
	E2	2.22	2	3	0
	E3	5.44	5	7	4
	E4	8	9	9	6
Pastoreo	E1	0	0	0	0
	E2	1.44	1	3	0
	E3	4.44	5	5	3
	E4	3.78	4	5	2
	E5	1.33	1	3	0
	E6	6.22	6	7	5
	E7	5.55	6	7	3
	E8	2.22	2	5	0
	E9	7.67	7	9	6
	E10	7	7	9	4
Vehículo de estiércol compartido	E1	0	0	0	0
	E2	3	3	5	1
	E3	6.89	7	9	4
Vehículo de purín compartido	E1	0	0	0	0
	E2	2.89	2	5	1
	E3	6.67	7	9	4
Vehículo para transporte de animales vivos (animales para matadero o cebo)	E1	0	0	0	0
	E2	1.11	1	2	0
	E3	2.67	2	5	1
	E4	2.11	2	4	1
	E5	3.44	3	5	2
	E6	3.22	3	5	2
	E7	4.78	5	6	3
	E8	4.44	4	7	2
	E9	6.22	7	8	3
	E10	0	0	0	0
Vehículo para transporte de animales muertos	E1	2.11	2	4	1
	E3	4.55	5	6	3
Vehículo de alimentación compartido	E1	0	0	0	0
	E2	2.55	2	4	2
	E3	4.78	5	6	3
Maquinaria / materiales compartidos	E1	0	0	0	0
	E2	0.55	1	1	0
	E3	1.78	2	3	0
	E4	5.22	5	7	3
	E5	2.22	3	4	0
	E6	5.78	6	7	3
Empleados (externos)	E1	2.11	2	3	0
	E2	4.55	5	5	4
	E3	2.78	3	5	0
	E4	6.11	7	7	4

Tabla 17. Valores ordinales medios para cada evento junto con los valores mínimo, mediano y máximo según opinión de expertos.

Según la opinión de los veterinarios, los eventos con puntuaciones asignadas más altas serían: compra ≥ 3 animales/año de granjas positivas (puntuación media 8,89 sobre 9), compra < 3 animales/año de granjas positivas (8.11 / 9), presencia de pequeños rumiantes positivos a MAP en la granja (8/9), animales < 6 meses en posible contacto con ganado de otras granjas en el pasto (7.67 / 9), compra ≥ 3 animales / año de granjas con estatus sanitario desconocido (7.33 / 9) , participación en ferias/concursos con retorno de los animales (7/9), y animales < 6 meses que van a pastos con posible contacto con pequeños rumiantes de otras granjas (7/9).

La puntuación total máxima que una granja podría obtener en caso de que todos los árboles de decisión tuvieran el evento con la puntuación más alta sería 77,89. El promedio de puntuación total en las 93 granjas estudiadas fue 24,60 (DE=7,62): 23,26 (5,92) en las granjas clasificadas negativas y 30,61 (10,72) en las positivas (p $< 0,001$). De acuerdo con la curva ROC, el punto de corte que mejor discriminó las granjas positivas y negativas fue 25,94. Este punto de corte proporciona un 68,8% de sensibilidad y un 68,7% de especificidad. Cinco de 51 granjas (9,8%) con puntuaciones por debajo de 25,94 fueron positivas, mientras que este porcentaje aumentó a 34,4% (11 de 32) entre aquellas con valores iguales o superiores a 25,94 (Tabla 18). Además, todas las granjas con una puntuación total superior a 42,99 fueron positivas (n = 3).

		Estatus de MAP de la granja		Total
		Negativo	Positivo	
Puntuación total	< 25.94	46	5	51
	≥ 25.94	21	11	32
Total		67	16	83

Tabla 18. Clasificación cruzada del estatus de MAP de las granjas (obtenido de los análisis de laboratorio como parte del programa de control) y la puntuación total de las granjas (obtenida de las prácticas de manejo de las granjas de acuerdo con las opiniones del grupo de expertos).

Para cada rebaño positivo, los dos eventos con la puntuación más alta según el grupo de expertos se presentan en la Tabla 19. En 5 de las 16 granjas positivas (31,2%), el evento con mayor puntuación estuvo relacionado con la compra de ganado mientras que en 6 de las 16 (37,5%) se relacionó con el ingreso de diferentes vehículos sin protocolos de limpieza y desinfección.

Granja	Evento con mayor puntuación	Evento con 2ª mayor puntuación
1	Vehículo de estiércol compartido sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.89)	Vehículo de purín compartido sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.67)
2	Animales menores de 6 meses que van al pasto con posible contacto con ganado de otras granjas (7.67)	Compra de 3 o más animales/año en granjas con estatus sanitario desconocido (7.33)
3	Compra de 3 o más animales/año en granjas con estatus sanitario desconocido (7.33)	Vehículo de estiércol compartido sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.89)
4	Vehículo de estiércol compartido sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.89)	Más de cuatro visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)
5	Compra de tres o más animales/año en granjas con estatus sanitario desconocido (7.33)	Vehículo de estiércol compartido sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.89)
6	Compra de tres o más animales/año en granjas con estatus sanitario desconocido (7.33)	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre granjas (6.22)
7	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre granjas (6.22)	Vehículo de alimentación compartido y sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (4.78)
8	Pequeños rumiantes en la granja con estatus sanitario desconocido (5.44)	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor no ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre granjas (4.78)
9	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre granjas (6.22)	Más de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)
0	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre granjas (6.22)	Más de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)
1	Compra ≥ 3 animales / año en granjas con estado sanitario desconocido (7.33)	Vehículo de alimentación compartido y sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (4.78)
2	Compra ≥ 3 animales / año de una granja con estado sanitario desconocido (7.33)	Vehículo de purines compartido y sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (6.67)
3	Más de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)	Vehículo de alimentación compartido y sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (4.78)
4	Los animales <6 meses salen a pastos con posible contacto con ganado de otras granjas (7.67)	Más de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)
5	Más de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (6.11)	El vehículo para el transporte de animales vivos entra en el perímetro de la granja con otros animales, el conductor no ayuda con la carga y no existen protocolos de limpieza y desinfección entre las granjas (4.78)
6	Vehículo de alimentación compartido y sin protocolo de limpieza y desinfección entre granjas (4.78)	Menos de 4 visitantes/mes sin ropa de protección (4.55)

Tabla 19. Los dos eventos con puntuación más alta de acuerdo con los valores medios asignados por el grupo de expertos en las 16 granjas de Galicia infectadas (puntuación media asignada para este evento).

5. DISCUSIÓN

Nuestro estudio mostró importantes deficiencias en la aplicación de medidas de bioseguridad, destacando particularmente el margen de mejora de medidas destinadas al control de diversas vías de posible introducción de enfermedades. Afortunadamente, la mayoría de las granjas no compran animales, lo que refleja un porcentaje más alto de rebaños "cerrados" que los descritos en otros estudios de bioseguridad en Europa (Brennan & Christley, 2012; Sayers *et al.*, 2014; Sahlström *et al.*, 2014; Sarrazin *et al.*, 2014). Entre los que lo hacen, todavía hay granjas que no evalúan regularmente el estado de salud de los animales incorporados. La escasez de instalaciones de cuarentena en las granjas es notable, y se ha observado anteriormente en otras poblaciones, pero ninguna exhibió tasas tan bajas como la de nuestra población (Sarrazin *et al.*, 2014; O'Doherty *et al.*, 2014). Se consideraron instalaciones de cuarentena adecuadas aquellos edificios separados, fuera del perímetro de la granja, donde los animales pueden permanecer durante un tiempo suficiente para confirmar su estado sanitario. Otros movimientos que pudieran suponer un riesgo (como toros de alquiler o compartidos) no se observaban en la población de estudio. El concepto de contacto con otros rumiantes en pasto comprendía cualquier contacto, ya sea directo o indirecto, con materia orgánica de rumiantes de otras explotaciones o con los propios animales (en el pasto o cuando se dirigen al mismo). En la población de estudio, en caso de pastoreo, las vacas fueron conducidas generalmente a prados en las inmediaciones de la granja pero, dada la alta densidad de establos en muchas de las áreas observadas, era bastante probable que se produjera contacto durante el pastoreo o en el camino hacia el mismo.

Distintos tipos de vehículos, especialmente los de alimentación, entraban con frecuencia en las granjas. También se deben mejorar las políticas relacionadas con los visitantes: por ejemplo, casi el 93% de las granjas podían recibir visitantes que tenían contacto con los animales y no usaban ropa protectora. Se ha observado una carencia similar en las granjas lecheras en Europa (Brennan & Christley, 2012; Sarrazin *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2018), aunque los países del norte de Europa informan de una mejor implementación de las medidas de bioseguridad al respecto (Sahlström *et al.*, 2014; Emanuelson *et al.*, 2018).

La aplicación de planes de bioseguridad en las granjas lecheras es voluntaria en casi todos los países, con excepciones como Dinamarca (Retsinformation, 2018). El reglamento (UE) N° 429/2016, que se aplicará a partir de 2021 y afectará a la legislación de salud animal de la UE, reconoce y aborda la importancia de la bioseguridad. Por lo tanto, los ganaderos deben estar motivados tanto para cambiar los comportamientos existentes como para implementar prácticas de bioseguridad efectivas para reducir el riesgo de introducción de enfermedades (Truyers *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2019; Piniór *et al.*, 2019).

Los análisis de MCA y TSCA muestran que existen 3 tipologías principales de fincas en relación a la implementación de medidas de bioseguridad diferenciadas especialmente por región (lo que implica una implementación diferente de los programas de control de BVDV y BoHV-1) y tamaño de rebaño. Aunque algunas limitaciones de bioseguridad son comunes, otras son más específicas para cada grupo, similar a la observación realizada previamente por Sarrazin *et al.*, (2014).

Así, el grupo 1 incluye los rebaños más pequeños en los que el volumen de negocio supondría un desafío para la inversión, lo que a su vez puede limitar la bioseguridad (es decir, estas granjas pueden verse obligadas a compartir con frecuencia algunos vehículos, maquinaria o materiales, mientras que infraestructuras como vallas perimetrales o estacionamientos para vehículos son escasas). Además, la gran cantidad de visitantes que reciben puede estar relacionada con el hecho de que las granjas pequeñas requieren con mayor frecuencia la colaboración puntual de ganaderos vecinos (por ejemplo, en el caso de un parto). También suelen recibir visitas de cortesía, ya que estas granjas son familiares y funcionan con estrechos vínculos entre la granja y el propio hogar del ganadero, como se ha descrito previamente (Moya *et al.*, 2019). A pesar de la falta de distintas medidas de bioseguridad, la proporción de estas granjas con infección reciente/activa por BoHV-1 o BVDV fue baja, posiblemente debido a varios factores. El más destacado se refiere a la naturaleza de los programas de control de BVD e IBR mencionados en España: son voluntarios y se ejecutan solo en algunas CC.AA. En Galicia y otras regiones del noroeste y el Cantábrico, estos programas se llevan a cabo principalmente a través de las Asociaciones de Defensa de la Sanidad Ganadera (ADSG) creadas por las Comunidades Autónomas en 2004. En Cataluña, estos programas están ausentes. Las explotaciones incluidas en el grupo 1 (y el grupo 2) eran todas de la región de Galicia, donde las ADSGs incluían el 55,2% de los rebaños y el 65,0% del censo de los bovinos gallegos y, por tanto, se encuentran bajo programas de control de BVD e IBR. Estos programas se basan en la vigilancia serológica de los rebaños y la reducción progresiva de la seroprevalencia (principalmente mediante el control de incorporaciones). Los animales seropositivos no se sacrifican. Sólo en el caso del BVDV, cuando las muestras analizadas indican una posible infección persistente (IP) en un animal (p.ej. para una novilla joven en la prueba serológica de antígeno), se identificaba y eliminaba el ganado con IP, en su caso. Para prevenir nuevas infecciones, es obligatorio analizar todos los animales comprados de BVDV y BoHV-1 utilizando los protocolos establecidos (DOGA, diciembre 2017). Esta medida se controla a través del registro oficial de movimientos de ganado (REMO) y la no realización de estas pruebas implica sanciones económicas (DOGA, diciembre 2017). Sin embargo, para los rebaños en ADSG, no hay obligación sobre otras medidas de bioseguridad, aunque se proveen recomendaciones para cada granja.

La existencia de programas de control tiene un impacto en el estado sanitario de estas granjas; sin embargo, aparte del control de los animales comprados (obligatorio), los programas de ADSG no parecen tener una influencia significativa en la aplicación de muchas otras medidas de bioseguridad (recomendadas, pero no obligatorias), a juzgar por las deficiencias que se han observado. Aunque se considera que el ganado comprado es el principal factor de riesgo de entrada de enfermedades en las granjas lecheras (Mee *et al.*, 2012; Presi *et al.*, 2011; Veldhuis *et al.*, 2017; Amelung *et al.*, 2018; Bezerra *et al.*, 2019), no debe subestimarse la importancia de otras medidas que pueden resultar en un menor aprovechamiento de los recursos destinados a los programas de control.

En el grupo 2, el estado sanitario más frecuente fue la presencia de animales seropositivos sin evidencia de infecciones recientes o activas; en el caso del BVDV, el porcentaje de granjas con infección activa es mayor que en el conglomerado 1, aunque todavía lejos del observado en el grupo 3. En general es más probable que el

virus persista en el tiempo en los rebaños más grandes. La persistencia vírica puede aumentar con el tamaño del rebaño ya que el denominado “self-clearance” puede ser más factible en rebaños pequeños debido a eventos estocásticos (Dramman *et al.*, 2015).

El grupo 3 incluyó los rebaños más grandes de nuestro estudio, ubicados en Cataluña. El tamaño del rebaño se ha descrito anteriormente como una variable de conjunto para varios riesgos de bioseguridad, como el aumento de la compra de animales, el aumento de visitantes (veterinarios, técnicos) y la presencia de trabajadores externos, todo lo cual aumentará la probabilidad de introducción y mantenimiento de enfermedades (Sayers *et al.*, 2015). Las granjas del grupo 3 de nuestro estudio cumplieron con todas estas características y, a menudo, compraban animales sin realizar pruebas. De manera relevante, como se mencionó, no se ha establecido ningún programa de control oficial en la región de Cataluña. Así, aunque algunas instalaciones de bioseguridad o medidas de bioseguridad fueron más frecuentes en estas granjas que en los otros dos grupos, el 3 mostró el nivel sanitario más pobre, especialmente en relación al BVDV.

Además, debe tenerse en cuenta que al comparar los grupos 1 y 2, observamos que las granjas que compran animales son algo más numerosas en el grupo 1, por lo que el tamaño del rebaño y el número de compras de animales no estaban directamente relacionados en estos dos conglomerados. Las explotaciones más pequeñas a veces combinan la producción lechera con otras actividades profesionales, utilizando la producción lechera para complementar los ingresos familiares (Barbeito & López, 2011). Por lo tanto, la falta de mano de obra e incluso de instalaciones para la cría de novillas podría explicar la mayor frecuencia de compras que las granjas más grandes incluidas en el 2.

Se debe considerar la influencia de nuestra metodología en estos resultados. Los cuestionarios se completaron durante entrevistas presenciales en las granjas en compañía del veterinario responsable del programa sanitario de la granja. Esto nos permitió explicar las preguntas con claridad y controlar el sesgo relacionado de deseabilidad social, aunque es posible que hubiéramos podido obtener un tamaño de muestra mayor utilizando cuestionarios enviados por correo. Además, es importante tener en cuenta que los ganaderos se inscribieron voluntariamente en el estudio y, por tanto, nuestros resultados no pueden extrapolarse directamente a todas las explotaciones lecheras de España debido a un posible sesgo de selección. Los ganaderos más preocupados por la bioseguridad podrían haber decidido participar en el proyecto con más frecuencia, lo que podría resultar en una sobre-representación de granjas con una implementación relativamente buena de las medidas de bioseguridad en nuestra muestra. Además, la existencia de programas voluntarios de control de BoHV-1 y BVDV en las ADSGs de Galicia, pero no en otras regiones, puede haber reducido el valor representativo de nuestra muestra. Sin embargo, a pesar de las limitaciones inherentes al mismo, el estudio proporciona una visión global de las principales deficiencias de bioseguridad en el sector ganadero de vacuno lechero de España. Dichos datos deberían ser útiles para enfocar la capacitación futura y mejorar las estrategias de reducción de riesgos en esta industria de importancia económica.

En relación a la paratuberculosis bovina, los trabajos realizados, como en el caso anterior, se centran, igualmente, en factores relacionados con la bioexclusión o

bioseguridad externa, es decir, factores asociados con la entrada de enfermedades en un rebaño, a diferencia de muchos otros estudios previos donde se evaluó este tema junto con medidas de biocontención. Los resultados del análisis de regresión enfatizan igualmente la importancia de una adecuada bioseguridad, con la compra de ganado jugando un papel central, como lo hicieron estudios recientes en otras poblaciones utilizando otros enfoques de diagnóstico (Puerto Parada *et al.*, 2018; Correa-Valencia *et al.*, 2019). El tamaño del rebaño se incluyó en el modelo múltiple como posible factor de confusión. El tamaño se ha relacionado con varios factores de riesgo, como el aumento de la compra de animales, el aumento de visitantes (veterinarios, técnicos) y la presencia de trabajadores externos, todo lo cual aumenta la probabilidad de introducción y mantenimiento de enfermedades (Sayers *et al.*, 2015).

Solo el 33,7% (n = 28) de las 93 granjas incluidas en esta parte del estudio compraban ganado. La principal diferencia entre el presente estudio y los estudios anteriores con planteamientos similares fue que, en Galicia, como ya se mencionó, las granjas del programa de control deben analizar todos los animales recién comprados, en el caso de la paratuberculosis, mediante ELISA de anticuerpos. A pesar de esto, las explotaciones que compran ganado corren un mayor riesgo, lo que pone de relieve las limitaciones de la prueba ELISA en suero a nivel individual (Sergeant *et al.*, 2019), y la falta de información verificada y completa sobre el estado general del establo de origen. (Sweeney *et al.*, 2012; Puerto-Parada *et al.*, 2018). Desafortunadamente, la mayoría de los ganaderos no solicita dicha información. En este estudio se consideró conocido el estado sanitario del rebaño de origen si contaba con un protocolo de muestreo comparable o superior al de los rebaños del programa de control de Galicia (negativo cuando todos los animales dieron negativo en todas las pruebas realizadas en el último muestreo antes de la compra de los animales o positivo si al menos un animal dio positivo en cualquier prueba). En ningún otro caso se consideró como conocido el estado sanitario del rebaño de origen (no hay protocolos de muestreo o si los hay son inferiores a los realizados en Galicia).

La mayoría de los estudios anteriores basados en análisis de regresión (en otras poblaciones y utilizando otros enfoques de diagnóstico) coincidieron en señalar la importancia de comprar animales que indican odd ratios entre 1,31 y 5,44 (Sorge *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2016; Puerto Parada *et al.*, 2018; Correa-Valencia *et al.*, 2019). Por el contrario, McAllon *et al.*, (2017), no encontraron que el comportamiento de compra en los 10 años previos fuera significativo.

Los resultados obtenidos a través del taller de expertos también enfatizan la importancia relativa de las medidas de bioseguridad consideradas, con los movimientos de animales (es decir, la frecuencia de introducciones y el estado sanitario en la granja de origen) jugando un papel central. Sin embargo, otras medidas de bioseguridad no se deben subestimar, especialmente el control de algunos vehículos y materiales compartidos y visitantes que tienen contacto con los animales.

Otras prácticas a las que los veterinarios otorgaron puntuaciones altas (> 7 sobre 9) se observan con menos frecuencia en la población de estudio (Villaamil *et al.*, 2020). Aunque, se ha sugerido que la transmisión entre especies de algunas cepas de MAP puede no ser tan rara si existe contacto estrecho entre las diferentes especies a nivel granja (Stevenson *et al.*, 2015), solo una pequeña proporción de las mismas

tenían pequeños rumiantes. Además, las granjas que permiten el pastoreo de terneros también son escasas.

En cualquier caso, en un rebaño, los animales más jóvenes son los de mayor susceptibilidad a la infección por MAP. Este tiende a moverse lentamente a través del suelo y permanecer en el pasto y capas superiores del suelo, lo que representa un peligro de infección para los animales en pastoreo (Singh *et al.*, 2013). La presencia de pequeños rumiantes en la granja es el evento con mayor puntuación en 1 de las 16 granjas clasificadas como infectadas en el estudio, mientras que el pastoreo de animales menores de 6 meses es el evento con mayor puntuación en 2 de ellas.

No obstante, deben tenerse en cuenta otros factores observados con mayor frecuencia en las explotaciones de Galicia y puntuados > 6 sobre 9 según la opinión de los expertos, especialmente los vehículos compartidos que entran en el perímetro de la explotación sin programas de limpieza y desinfección entre explotaciones (p. ej., camiones de transporte de estiércol, purines o animales vivos) o visitantes sin ropa protectora. Estos factores han sido menos evaluados en estudios previos, pero, en cualquier caso, podrían ser de gran importancia en base a las puntuaciones dadas por los expertos y por ser eventos que ocurren con frecuencia en la población de estudio (Villaamil *et al.*, 2020). Los vehículos compartidos o los visitantes sin ropa protectora son el evento de puntuación más alta en 6 de 16 granjas positivas.

Ciertos entornos de una granja tienen más probabilidades de estar contaminados con MAP y niveles de contaminación promedio más altos. Estas áreas de alto riesgo incluían zonas de almacenamiento de estiércol y pasillos, lugares en los que se mezclan deyecciones de las vacas adultas (Smith *et al.*, 2011). El vehículo del estiércol es al que los expertos asignan mayor riesgo. En lo que respecta a los visitantes, el calzado ha sido considerado anteriormente como un fómite de alto riesgo para la dispersión de MAP (Eisenberg *et al.*, 2012).

Dadas las características de la enfermedad, el principal punto de control para prevenir la infección de las granjas debe ser la implementación de sólidas medidas de bioseguridad para evitar la introducción de la bacteria. En base a la opinión de los expertos participantes, fue posible otorgar una puntuación a cada estable en función de su nivel de bioseguridad que permite discriminar con más del 68% de sensibilidad y especificidad las granjas con alto y bajo riesgo de infección. Los resultados sugieren que los programas de control podrían identificar y enfatizar aquellas prácticas que para cada finca presentan un mayor riesgo.

En cuanto a la metodología utilizada, una posible limitación es que las pruebas de PCR solo se realizaron en animales seropositivos. Existe la posibilidad de que vacas con ELISA negativo resulten positivas al cultivo fecal; podrían ser el resultado de la diseminación pasiva debido al paso de MAP por el tracto intestinal (Pradhan *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha indicado que las hembras ELISA positivas tienen hasta 8,8 veces más probabilidades de eliminar la bacteria (Ayele *et al.*, 2005). Además, para el estudio, los datos de laboratorio se evaluaron a nivel de rebaño, no a nivel individual.

Dada la importancia de la gestión de los factores de riesgo para el control de la MAP, es muy recomendable realizar estudios de dichos factores en las regiones donde se van a implementar los programas de control. A pesar de las limitaciones

inherentes de este estudio, creemos que ha proporcionado una visión general completa de los principales factores relacionados con la entrada de MAP en las granjas lecheras. Estos datos deberían ser útiles para enfocar la capacitación futura y mejorar las estrategias de reducción de riesgos en esta industria de relevancia económica.

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados del trabajo indicaron que, en la población de explotaciones bovinas lecheras motivo de estudio, existen graves deficiencias en la aplicación de medidas de bioseguridad, exponiéndolas a la transmisión de enfermedades como la diarrea vírica bovina y la rinotraqueitis infecciosa bovina. El estudio también destacó diferencias en la implementación de la bioseguridad según la región analizada y el tamaño del rebaño. La recopilación de datos es un primer paso importante para la identificación de debilidades específicas en las diferentes tipologías de granjas, siendo necesario un adecuado seguimiento para garantizar que las medidas se implementen correctamente en las explotaciones.
2. El segundo estudio resalta la importancia de una bioseguridad adecuada para evitar la introducción de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* con la compra de ganado jugando un papel esencial; de tal modo que las granjas bovinas lecheras que compraban ganado en otras explotaciones con estatus sanitario desconocido frente a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* y con una frecuencia anual media superior a 3 animales, así como aquellas explotaciones con un censo superior a 117 cabezas, presentaban un riesgo más alto de introducción de la infección.
3. Los resultados del taller de expertos enfatizan la importancia relativa de las medidas de bioseguridad consideradas, destacando el movimiento de animales desde los siguientes aspectos: la frecuencia de introducciones de animales y el estado sanitario en las granjas de origen, la salida a pastos de animales menores de seis meses y la presencia de pequeños rumiantes en la misma granja. Sin embargo, no se deben subestimar otras medidas de bioseguridad como son el control de vehículos y/o materiales compartidos y los visitantes que tienen contacto con los animales.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann, M., Engels, M., 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.*, 113: 293-302.

Acord, B.R., Walton, T.E., 2004. Animal health organizations – Roles to mitigate the impact of ecologic change on animal health in the tropics. Impact of Ecological Changes on Tropical Animal Health and Disease Control. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1026, 32–40.

AFRICOR. 2018. Memoria Africor Lugo.

Aguirre, I.M., Fuentes, R., Celedón, M.O., 2014. Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. *Vet. Microbiol.*, 168, 312–317.

Akerstedt, J., Tarpai, A., Mork, T., 2010. The surveillance and control programme for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and infectious pustular vulvovaginitis (IPV) in Norway, Annual Reports 2009. In: Surveillance and Control Programmes for Terrestrial and Aquatic Animals in Norway, National Veterinary Institute, Oslo, Norway, pp. 1–5.

Aly, S.S, Thurmond, M.C., 2005. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 227, 450-454.

Aly, S.S., Anderson, R.J., Whitlock, R.H., and Adaska, J.M., 2014. Sensitivity and specificity of two enzyme-linked immunosorbent assays and a quantitative real-time polymerase chain reaction for bovine paratuberculosis testing of a large dairy herd. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 12,1-7.

Amelung, S., Hartmann, M., Haas, L., Kreienbrock, L., 2018. Factors associated with the bovine viral diarrhoea (BVD) status in cattle herds in Northwest Germany. *Vet. Microbiol.*, 216, 212-217.

Anderson, M. L., 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, 68, 474–486.

ANSES, 2012. Avis de l'ANSES relatif à “la hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine.” Saisine n° «2010-SA-0280», Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons-Alfort, France.

Armengol, R., 2017. ¿Qué le cuesta a una granja descuidar el control del agente causante de la IBR?. Available online: <https://www.campogalego.es> (accessed on 1 december 2020).

Arnaiz, I. Yus, E., Diéguez, F.J., 2015. Diarrea vírica bovina: variabilidad antigénica, impacto económico, diagnóstico y vacunas. *Producc. Anim.*, 289, 6-14.

Arnaiz, I., Eiras, C., Carnero, M.I., Rubinos, V., Calavia, P.M., Cortón, M.E., López, M., Yus, E., Diéguez, F.J., Orejas, J.J., Mourelo, J.E., Martínez, S., 2018. 15 años de programa de control voluntario frente al IBR en Galicia: situación ante un programa de erradicación. XXIII Congreso Internacional de Medicina Bovina Anembe, Vigo. pp 348-349.

Ata, A., Kocamüftüoğlu, M., Hasircioğlu, S., Kale, M., Mgülay, Ş., 2012. Investigation of relationship between bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infection and fertility in repeat breeding dairy cows in family-type small dairy farms. *J. Kafkas Univ. Vet., Fac.* 18, 579-583.

Atkinson, O., 2010. Communication in farm animal practice 1. Farmer-vet relationships. *In Pract.* 32, 114–117.

Avila, M., Rodríguez Medina, M., Díaz de Arce, H., Barrera, M., 2008. Diagnóstico virológico de Herpesvirus bovino tipo 1. *Redvet.*, vol. IX, nº 3.

Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71,1210-1214.

Azbel-Jackson, L., Hefferman, C., Gunn, G., Brownlie, J., 2018. Exploring the role of voluntary disease schemes on UK farmer bio-security behaviours: Findings from the Norfolk-Suffolk bovine viral diarrhoea control scheme. *PlosOne*, 13, e0177987.

Baker, J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clinics North Am. – Food Animal Practice*, 11, 425–446.

Bandyopadhyay, S., Das, S., Baruah, K.K., Chakravarty, P., Chakrabarty, D., Sarkar, T., Pal, B., De, S., Pan, D., Bera, A.K., Bandyopadhyay, S., Bhattacharya, D., 2010. Detection of bovine herpesvirus 1 sequences in yaks (*Bos grunniens*) with keratoconjunctivitis, using a highly sensitive nested polymerase chain reaction, 2010. *Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epiz.*, 29, 695-703.

Bannantine, J.P., Bermúdez, L.E., 2013. No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.*, 81,3960–5.

Bannantine, J.P., Huntley, J.F., Miltner, E., Stabel, J.R., Bermúdez, L.E., 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*, 149,2061–9.

Barbeito, F., López C., 2011. Resultados técnico-económicos das explotacións de vacún de leite en Galicia. 1st ed. Xunta de Galicia.

Barkema, H.W., von Keyserlingk, M.A.G., Kastelic, J.P., Lam, T.J.G.M., Luby, C., Roy, J.P., LeBlanc, S.J., Keefe, G.P., Kelton, D.F., 2015. Invited review: changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *J. Dairy Sci.*, 98, 7426–7445.

Barkema, H.W., Orsel, K., Nielsen, S.S., Koets, A.P., Rutten, V.P.M., Bannantine, J.P., Keefe, G.p., Kelton, D.F., Wells, S.J., Whittington, R.J., Mckintosh, C.G., Manning, E.J., Weber, M.F., Hener, C., Forde, T.J., Ritter, C., Roche, S., Corbett, C.S., Wolf, R., Griebel, P.J., Kastelic, J.P., De Buck, J., 2018. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65 (Suppl.1),125-148.

Barrett, D.J., Mee, J.F., Mullaney, P., Good, M., McGrath, G., Clegg, T., More, S.J., 2011 Risk factors associated with Johne's disease test status in dairy herds in Ireland. *Vet. Rec.*,168, 410.

Bastida, F., Juste, R.A., 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther.Vaccines.* 9, 8.

Beaudeau, F., Assie, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E., Joly, A., 2001a. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Vet. Rec.*, 149, 236–240.

Becher, P., Orlich, M., Shannon, AD., Horner, G., König, M., Thiel, H.J., 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, 78, 1357–1366.

Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., Thiel, H.J., 1999. Genetic diversity of pestiviruses, identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262, 64–71.

Becher, P., Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo-Rosales, S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeyer, H., Thiel, H.J., 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes, implications for classification. *Virology*, 311, 96–104.

Becher, P., Fischer, N., Grundhoff, A., Stalder, H., Schweizer, M., Postel, A., 2014. Complete genome sequence of bovine pestivirus strain PG-2, a second member of the tentative pestivirus species Giraffe. *Genome Announc.*, 3, e00376-14.

Behr, M.A., Collins. D.M., 2010. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Wallingford, UK: CABI: 375.

Benavides, B., Allepuz, A., Yus, E., Casal, J., Moya, J., Diéguez, F.J., 2018. Sanitary status against bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis and biosecurity measures applied in dairy farms in Catalonia and Galicia. Page 576 in Proc. 15th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Chiang Mai, Thailand.

Benavides, B., Casal, J., Diéguez, F.J., Yus, E., Moya, S.J., Armengol, R., Allepuz, A., 2019. Development of a quantitative risk assessment of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 introduction in dairy cattle herds to improve biosecurity. *J. Dairy Sci.*, 103, 6454-6472.

Benavides, B., Casal, J., Diéguez, F.J., Yus, E., Moya, S.J., Allepuz, A., 2021. Quantitative risk assessment of introduction of BVDV and BoHV-1 through indirect contacts based on implemented biosecurity measures in dairy farms of Spain. *Prev. Vet. Med.*, 198, 105263.

Benedictus, G., 1984. Evaluation of organized control of bovine paratuberculosis in Friesland province, The Netherlands. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 109, 905–916.

Bennett, R., 2003. The ‘direct costs of livestock disease’: the development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. *J.Agric. Econ.*, 54, 55–71.

Bennett, R. M., Mawhinney, I., 1999. The cost of BVD. BCVA Congress. Glasgow, 22-23. Oct. 1999.

Ben Romdhane, R., Beaunée, G., Camanes, G., Guatteo, R., Fourichon, C., Ezanno, P., 2017. Which phenotypic traits of resistance should be improved in cattle to control paratuberculosis dynamics in a dairy herd: a modelling approach? *Vet. Res.*, 48, 62.

Bermudez, L.E., Petrofsky, M., Sommer, S., Barletta, R.G., 2010. Peyer’s patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect. Immun.*, 78, 3570–3577.

Bezerra, N.P.C., Bezerra, D.C., Santos, H.P., Pereira, H. de M., 2019. Risk factors analysis applied to antibodies to Bovine Herpesvirus Type 1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Bovine Leukemia Virus and *Brucella abortus* among cattle: a cross-sectional study. *Acta Vet. Bras.*, 13, 5-12.

Bhattacharai, B., Fosgate, G. T., Osterstock, J. B., Fossler, C. P., Park, S. C., Roussel, A. J., 2014. Comparison of calf weaning weight and associated economic variables between beef cows with and without serum antibodies against or isolation from feces of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *J.Am.Vet.Med. Assoc.*, 243, 1609–1615.

Bhudevi, B., Weinstock, D., 2003. Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J.Virol.Med.*, 109, 25–30.

Bianchi, M.V., Konradt, G., de Souza, S.O., Bassuino, D.M., Silveira, S., Mosena, A.C., Canal, C.W., Pavarini, S.P., Driemeier, D., 2017. Natural outbreak of BVDV-1d induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Vet. Pathol.*, 54, 242–248.

Bielanski, A., Loewen, K., 1994. In-vitro fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Anim. Reprod. Sci.*, 35, 183-189.

Biswas, S., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., Patra, P.H., 2013. Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology and prophylaxis. *Vet. Quart.*, vol. 33, n° 2, 68-81.

Bitsch, V., Hansen, K. E., Rønsholt, L., 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD)1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet. Microbiol.*, 77, 137–143.

Biuk-Rudan, N., Cvetnic, S., Madic, J., Rudan, D., 1998. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology*, 51, 875-881.

Björkman, C., Alenius, S., Manuelsson, U., Uggla, A., 2000. Neospora caninum and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet. J.*, 159, 201–206.

Blickenstorfer, S., Schwermer, H., Engels, M., Reist, M., Doherr, M.G., Hadorn, D.C., 2011. Using scenario tree modelling for targeted herd sampling to substantiate freedom from disease. *BMC Vet. Res.*, 16, 49.

Bock, R.E., Rodwell, B.J., McGowan, M., 1997. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in South-Eastern Queensland. *Aus.Vet. J.*, 75, 656–659.

Boelaert, F., Speybroeck, N., de Kruif, A., Aerts, M., Burzykowski, T., Molenberghs, G., Berkvens, D.L., 2005. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev. Vet. Med.*, 69, 285–295.

Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Coria, M. F., 1985. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am. J.Vet. Res.*, 46, 884–886.

Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Coria, M.F., 1985. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am.J.Vet.Res.*, 46, 2385–2387.

Bolin, S.R., Ridpath J.F., 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 135-139.

Bolin, S.R., Ridpath. J.F., 1990. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am.J.Vet.Res.*, 51,703-707.

Booker, C.W., Abutarbush, S.M., Morley, P.S., Guichon, P.T., Wildman, B.K., Jim, G.K., Schunicht, O.C., Pittman, T.J., Perrett, T., Ellis, J.A., Appleyard, G., Haine, D.M., 2008. The effect of bovine viral diarrhoea virus infections on health and performance of feedlot cattle. *Can.Vet. J.*, 49, 253–260.

Booth, R.E., Brownlie, J., 2012. Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset. *Vet. Rec.*, 170, 29–35.

Booth, R., MacGillivray, F., Armstrong, D., Brownlie, J., 2016. Control of bovine viral diarrhoea virus at the national level: a brief summary of European BVD control past, present and future. *Livestock*, 21, 338-345.

Bosch, J.C., Kaashoek, M.J., Kroese, A.H., van Oirschot, J.T., 1996. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet.Microbiol.*, 52, 223–234.

Bosch, J.C., De Jong, M.C., Franken, P., Frankena, K., Hage, J.J., Kaashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Noordhuizen, J.P., van der Poel, W.H., Verhoeff, J., Weerdmeester, K., Zimmer, G.M., Van Oirschot, J.T., 1998. An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, 16, 265–271.

Bøtner, A., Belsham, G.J., 2012. Virus survival in slurry: analysis of the stability of foot and- mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. *Vet.Microbiol.*, 157, 41–49.

Bottoms, K., Poljak, Z., Dewey, C., Deardon, R., Holtkamp, D., Friendship, R., 2012. Investigation of strategies for the introduction and transportation of replacement gilts on southern Ontario sow farms. *BMC Vet. Res.*, 8, 217.

Brennan, M.L., Christley, R.M., 2012. Biosecurity on cattle farms: a study in north-west England. *PLoS One*, 7, e28139.

Brennan, M.L., Christley, R.M., 2013. Cattle producers' perceptions of biosecurity. *BMC Vet. Res.*, 9, 71.

Brinkhof, J., Zimmer, G., Westenbrink, F., 1996. Comparative study on four enzymelinked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus.

Britton, L.E., Cassidy, J.P., O'Donovan, J., Gordon, S.V., Markey, B., 2016. Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *The Vet. J.*, 209, 32-39.

Brock, K.V., Redman, D.R., Vickers, M.L. Irvine, N.E., 1991. Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3, 99-100.

Brock, K. V., Grooms, D. L., Givens, M. D., 2005. Reproductive disease and persistent infections. In S. M. Goyal, & J. F. Ridpath (Eds.), *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management and control* (pp. 145–156). Ames, IA: Blackwell Publishing.

Brodersen, B. W., 2004. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clinics North Am. Food Anim. Pract.*, 20, 85–93.

Brodersen, B.W., 2014. Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. *Vet. Pathol.*, Vol.51(2) 453-464.

Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J., Pocock, D. H., 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.*, 18, 157–166.

Brownlie, J., Hooper, L.B., Thompson, I., Collins, M.E., 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – The bovine pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.*, 10, 141–150.

Brownlie, J., Booth, R., 2014. Bovine viral diarrhoea: update on disease and its control. *Vet. Times*, May 19, 10-12.

Byrne, N., 2010. BVD Case Study Teagasc Research Farm Ballydague. 2010. Available at: <http://www.animalhealthireland.ie/pdf/BVDRoadshows-NoelByrnes.pdf> (Accessed on 15 July 2019).

Caldow, G., Gunn, G. J., 2001. Assessment of surveillance and control of Johne's disease in farm animals in Great Britain. Retrieved from www.defra.gov.uk/animalh/diseases/sac2.PDF (Accessed on 9 May 2017).

Caldow, G., 2004. Biosecurity, does it have a place in the management of beef herds in the United Kingdom. *Cattle Practice*, 12, 149–153.

Callejo, A., 2016. Bioseguridad en las granjas de vacuno de leche. Ed. Servet. Zaragoza.

Can, M.F., Altug, N., 2014. Socioeconomic implications of biosecurity practices in small-scale dairy farms. *Vet. Quart.*, 34, 67-73.

Can, M.F., Ataseven, V.S., Yalçın, C., 2016. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) infection. *Vet.archiv.*, 86, 499-513.

Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A., Anderson, N., 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 27–35.

Carta, T., Álvarez, J. Pérez de la Lastra, J.M., Gortázar, C., 2013. Wildlife and paratuberculosis: A review. *Res.Vet. Sci.*, 94, 191-197.

Castel, J.M., Mena, Y., Ruiz, F.A., Morales, E., 2011. Ruminant Production Systems in Spain: Sustainability Analysis de Theoretical and empirical studies on farming systems in Spain and Poland. Wiesław Mądry, Jose Maria Castel, Marcin Ollik, Barbara Roszkowska-Mądra. Warsaw and Sevilla, Wydawnictwo SGGW, Warsaw, Poland

Charleston, B., Fray, M.D., Baigent, S., Carr, B.V., Morrison, W.I., 2001. Establishment of persistent infection with non cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type 1 interferon. *J. Gen. Virol.*, 82, 1893–1897.

Chase, C.C.L., 2013. The impact of BVDV infection on adaptative immunity. *Biologicals*, 41, 52-60.

Chaubey, K.K., Gupta, R.D., Gupta, S., Singh, S.V., Bhatia, A.K., Jayaraman, S., Kumar, N., Goel, A., Rathore, A.S., Sahzad, Sohal, J.S., Stephen, B.J., Sigh, M., Dhama, K., Derakhshandeh, A., 2016. Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *Vet. Quart.*, 36, 203-227.

Chernick, A., Godson, D.L., van der Meer, F., 2014. Metadata beyond the sequence enables the phylodynamic inference of bovine viral diarrhoea virus type 1a isolates from Western Canada. *Infect. Genet. Evol.*, 28, 367–374.

Chi, J., Van Leeuwen, J. A., Weersink, A., Keefe, G.P., 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Prev. Vet. Med.*, 55, 137-152.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74, 218-262.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., 1985. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine, caprine and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 1980-1989.

Cho, H.J., Masri, S.A., Deregt, D., Yeo, S.G., Thomas, E.J., 1991. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibody in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 55, 56–59.

Ciliberti, A., Gavier-Widén, D., Yon, L., Hutchings, M. R., Artois, M., 2015. Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert based risk analysis focus on ruminants. *Prev. Vet. Med.*, 118(4), 271–284.

Clarke, C. J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.*, 116, 217–261.

Coad, M., Clifford, D.J., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O, 2013. The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.*, 172(10), 266.

Collins, M. T., 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204, 208–210.

Collins, M.E., Heaney, J., Thomas, C.J., Brownlie, J., 2009. Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection. *Vet. Microbiol.*, 138, 289–296.

Collins, M. T., 2001. Prevention of paratuberculosis. *Bull. Internat. Dairy Federat.*, 364, 46–53.

Collins, M.T., Eggleston, V., Manning, E.J.B., 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *J. Dairy Sci.*, 93, 1638–1643.

Cook, A.J.C., (Guest Editorial) 2013. Implementing biosecurity on dairy farms. *The Vet. J.*, 197, 118-119.

Cornish, T.E., van Olphen, A.L., Cavander, J.L., Edwards, J.M., Jaeger, P.T., Vieyra, L.L., Woodard, L.F., Miller, D.R., O'Toole, D., 2005. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 17, 110–117.

Correa-Valencia, N.M., Ramírez, N. F., Arango-Sabogal, J. C., Fecteau, G., and Fernández-Silva, J.A., 2019. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy herds in Northern Antioquia (Colombia) and associated risk factors using environmental sampling. *Prev. Vet. Med.*, 170,10 4739.

Cowley, D. J., Graham, D. A., Guelbenzu, M., Doherty, M. L., More, S. J., 2014. Aspects of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus herd-level seroprevalence and vaccination in dairy and beef herds in Northern Ireland. *Ir.Vet.J.*, 67, 18

Crook, T.C., 2011. Investigating the role of bovineherpesvirus-1 in abortion and systemic disease in cattle. PhD thesis, College of Medicine and Veterinary Medicine, University of Edinburgh.

Daly, R., 2011. Biosecurity at the farm level: The role of extension in preventing animal disease introductions. *J. Dairy Sci.*, 94, 672

Damman, A., Viet, A.F., Arnoux, S., Guerrier-Chatellet, M-C., Petit, E., Ezzanno, P., 2015. Modelling the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity. *Vet. Res.*,46,12.

Dargatz, D.A., Byrum, BA, Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H., Stabel, J.R., 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218,1163–1166.

Decaro, N., Lanave, G., Lucente, M. S., Mari, V., Varello, K., Losurdo, M., Larocca, V., Bozzetta, E., Cavaliere, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2014. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 2946–2954.

De la Fuente, R., Bayón, C., Cid, D., García, A., García, S., Orden, J.A., Peñaranda, M.A., Ruiz, J.A., Sanz, R., Vega, S., 1996. Diarrea vírica bovina. *Bovis*, 73.

Del Fava., E. M., Pituco, C., Figueiredo, L.A., Razook, A.G., Cyrillo, J.N.S.G., Oliveira, J.V., Reichert, R.H., D'angelino, J.L., 2006. Reproductive rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine Herpesvirus. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 43, 739-746.

Delgado, A.H., Norby, B., Dean, W.R., McIntosh, W.A., Scott, H.M., 2012. Utilizing qualitative methods in survey design: Examining Texas cattle producers' intent to participate in foot-and-mouth disease detection and control. *Prev. Vet. Med.*, 103, 120–135.

Delhon, G., Moraes, M. P., Lu, Z., Afonso, C. L., Flores, E. F., Weiblen, R., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, 77, 10339-10347.

Deng, M., Ji, S., Fei, W., Raza, S., He, ..., Chen, Y., Chen, H., Guo, A., 2015. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus BVDV in Four Bovine Species in China. *PLoS One*, 104, e0121718.

Dhand, N.K., Eppleston, J., Whittington, R.J., Windsor, P.A., 2016. Changes in prevalence of ovine paratuberculosis following vaccination with Gudair(R): results of a longitudinal study conducted over a decade. *Vaccine*, 34(42), 5107–5113.

Diario Oficial de Galicia (DOGA). ORDEN de 27 de diciembre de 2017 por la que se establecen las bases reguladoras de las ayudas a las entidades reconocidas como agrupaciones de defensa sanitaria ganaderas (ADSG) de Galicia y se convocan para el año 2018-2019. Available: https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2018/20180117/AnuncioG0426-2712170003_es.html https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2018/20180117/AnuncioG0426-271217-0003_e.html

Dias, J.A., Alfieri, A.A., Ferreira-Neto, J.S., Goncalves, V.S., Muller, E.E., 2013. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Parana, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.*, 60, 39–47.

Diéguez, F.J., Arnaiz, I.; Sanjuán, M.L., Vilar, M.J., Yus, E., 2008. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet Rec.*, 162, 614-617.

Diéguez, F.J., Arnaiz, I.; Sanjuán, M.L., Vilar, M.J., López, M., Yus, E., 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev. Vet. Med.*, 82, 321-326.

Diéguez, F.J., González, A.M., Menéndez, S., Vilar, M.J., Sanjuán, M.L., Yus, E., Arnaiz, I., 2009. Evaluation of four commercial serum ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet. J.*, 180, 231-235.

Diéguez, F.J., Yus, E., Sanjuán M.L. Vilar, M.J. Arnaiz, I., 2008. Monitoring bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection status in dairy herds. *Pesq.Vet. Bras.*, 28, 588-592.

Diéguez, F.J., 2007. Programas de control de enfermedades infecciosas endémicas del ganado vacuno en Galicia: Diarrea vírica bovina y paratuberculosis bovina. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.

Diéguez, F.J., Yus, E., Vilar, M.J., Sanjuán M.L. Arnaiz, I., 2009. Effect of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on Dairy calf rearing. *Res.Vet. Sci.*, 87, 39-40.

D'offay, J. M., Fulton, R. W., Eberle, R., 2013. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. *Arch.Virol.*, 158, 1109-1113

D'offay, J. M., Eberle, R., Fulton, R. W., Kirkland, P. D., 2016. Complete genomic sequence and comparative analysis of four genital and respiratory isolates of bovine herpesvirus subtype 1.2b (BoHV-1.2b), including the prototype virus strain K22. *Arch.Virol.*, 161, 3269-3274

Doménech, J.M., 2004. Análisis multivariante. Modelos de regresión. UD6. Construcción de un modelo de regresión múltiple para evaluar un efecto en presencia de interacción y confusión. 1st ed. Signo, Barcelona.

Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., De La Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López Galindez, C., Pérez Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., Holland, J., 1985. The quasispecies extremely heterogeneous nature of viral RNA genome populations, biological relevance. *Gene*, 40, 1–8.

Donat, K., Schmidt, M., Köhler, H., Sauter-Louis, C., 2016. Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 99, 3744–3752.

Donat, K., 2016. The Thuringian bovine paratuberculosis control programme—results and experiences. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 130, 42–49.

Drew, T.W., Yapp, F., Paton, D.J., 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, 64, 145–154.

Driskell, E.A., Ridpath, J.F., 2006. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *J.Vet. Diagn. Invest.*, 18, 600–605.

Dubovi, E.J., 2013. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41, 8–13.

Dufour, B., Plée, L., Moutou, F., Boisseleau, D., Chartier, C., Durand, B., Ganière, J.P., Guillotin, J., Lancelot, R., Saegerman, C., Thébault, A., Hattenberger, A.M., Toma, B., 2011. A qualitative risk assessment methodology for scientific expert panels. *Rev. Sci. Tech.*, 30, 673–681.

Duncan, A. L., 1990. Health security in cattle herds. *In Practice*, 12, 29–32.

Duncan, A.J., Gunn, G.J., Humphry, R.W., 2016. Difficulties arising from the variety of testing schemes used for bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Vet. Rec.*, Mar., 19, 178(12), 29.

Durham, P.J., Hassard, L.E., 1990. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can. Vet. J.*, 31, 815–820.

Edwards, S., White, H., Nixon, P., 1990. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. *Vet. Microbiol.*, 22, 213-223

Eiras, C., 2009. Diarrea vírica bovina (BVD), rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y neosporosis bovina en Galicia: evaluación de la situación epidemiológica y diagnóstico en la leche de tanque. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Eiras, C. Arnaiz, I., Sanjuán, M.L. Yus, E. Diéguez, F.J., 2012. Bovine viral diarrhoea virus: Correlation between herd seroprevalence and bulk tank milk antibody levels using 4 commercial immunoassays. *Spanish J. Agricult. Res.*, 24, 549-553.

Eiras, C., Cerviño, M., Yus, E., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2019. Phylogenetic analysis and spatial distribution of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy cattle from Galicia (NW Spain). *Spanish J. Agricult. Res.*, 17, e0503.

Eiras, C., Diéguez, F.J., Sanjuán, M.L., Yus, E., Arnaiz, I., 2009. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 in cattle in Galicia (NW Spain). *Spanish J. Agricult. Res.*, 7, 800-806.

Eiras, C., Arnaiz, I., 2010. Programa sanitario en las ADSG de vacuno en Galicia. *Cría y salud*, 32, 40-47.

Eisenberg, S.W.F., Nielen, M., Santema, W., Houwers, D.J., Heederik, D., Koets, A.P., 2010. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol.*, 143, 284–292.

Eisenberg, S. W. F., Nielen, M., Hoeboer, J., Rutten, V., Heederik, D., Koets, A. P., 2012. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within and around a dairy barn under experimental conditions. *J. Dairy Sci.*, 95(11), 6477-6482.

Elam, N.A., Thomson, D.U., Gleghorn, J.F., 2008. Effects of long- or short-term exposure to a calf identified as persistently infected with bovine viral diarrhoea virus on feedlot performance of freshly weaned, transport-stressed beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 86:1917–1924.

Eliot, M., 1997. Identification and monitoring of IBR-free herds in the French IBR certification programme. In: Franken, P. (Ed.), *IBR Control Programmes, Qualification and Monitoring of the IBR-free Status*, Maastricht, The Netherlands, 26–27 June, pp. 15–16.

Ellis-Iversen, J., Cook, A.J.C., Watson, E., Nielen, M., Larkin, L., Wooldridge, M., Hogeveen, H., 2010. Perceptions, circumstances and motivators that influence implementation of zoonotic control programs on cattle farms. *Prev. Vet. Med.*, 93, 276–85.

Emanuelson, U., Sjöström, K., Fall, N., 2018, Biosecurity and animal disease management in organic and conventional Swedish dairy herds: a questionnaire study. *Acta Vet. Scand.*, 60, 23.

Enticott, G., Donaldson, A., Lowe, P., Power, M., Proctor, A., Wilkinson, K., 2011. The changing role of veterinary expertise in the food chain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sci.*, 366, 1955–1965.

Enticott, G., Franklin, A., Van Winden, S., 2012. Biosecurity and food security: spatial strategies for combating bovine tuberculosis in the UK. *Geograph. J.*, 178, 327–337.

European Commission 2004. Decisión 2004/558/CE. Decisión de la Comisión de 15 de julio de 2004 por la que se aplica la Directiva 64/432/CEE del Consejo en lo que respecta a las garantías adicionales para los intercambios intracomunitarios de animales de la especie bovina relacionados con la rinotraqueitis infecciosa bovina y a la aprobación de los programas de erradicación presentados por determinados miembros.

European Commission, 2007. A new Animal Health Strategy for the European Union (2007–2013) where “Prevention is better than cure”. Available: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/index_e.htm http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/strategy/index_e.htm

European Commission. Commission Implementing Decision (EU) 2017/486 of 17 March 2017 amending Annexes I and II to Decision 2004/558/EC. Available: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?qid=1556212590594&uri=CELEX:32>

Evans, C.A., Pinior, B., Larska, M., Graham, D., Schweizer, M., Guidarini, C., Decaro, N., Ridpath, J., 2019. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, 66, 640–652.

Evermann, J. F., Barrington, G. M., 2005. Clinical features. In S. M. Goyal, & J. F. Ridpath (Eds.), *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management and control* (pp. 105–119). Ames, IA: Blackwell Publishing.

Ezanno, P., Fourichon, C., Seegers, H., 2008. Influence of herd structure and type of virus introduction on the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a dairy herd. *Vet. Res.*, 39, 39.

Factor, C., 2017. Aportaciones al control de la diarrea vírica bovina en explotaciones incluidas en ADSG: diversidad genética del virus, descripción de un brote en ganado ovino y valoración de las medidas de bioseguridad. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Factor, C., Yus, E., Eiras, C., Sanjuán, M.L., Cerviño, M., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2016. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses from the Galicia region of Spain. *Vet. Rec. Open*, 3,e000196.

Fairbanks, K.F., Campbell, J., Chase, C.C.L., 2004. Rapid onset of protection against infectious bovine rhinotracheitis with a modified-live virus multivalent vaccine. *Vet. Ther.*, 5, 17–25.

Farmlab diagnostic, 2018. Available online: <https://www.farmlab.ie/2018/12/testing-for-infectious-bovine-rhinotracheitis-ibr> (Accessed on 3 December 2020).

Faust, M.A., Kinsel, M.L., Kirkpatrick, A., 2001. Characterizing biosecurity, health, and culling during dairy herd expansions. *J. Dairy. Sci.*, 84, 955-965.

Fawzy, A., Zschöck, M., Ewers, C., Eisenberg, T., 2018. Genotyping methods and molecular epidemiology of *Micobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (MAP). *Int. J. Vet. Med.*, 258-264

Fecteau, M.E., Whitlock, R.H., 2010. 14 Paratuberculosis in Cattle. *Paratuberculosis: organism, disease, control*, 144.

Fernández, F., Costantini V., Barrandeguy, M., Parreño, V., Schiappacassi, G., Maliandi, F., Leunda, M., Odeón, A., 2009. Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhoea in bovines, ovines and Guinea pigs. *Rev. Arg. Microbiol.*, 41, 86–91.

Ferrouillet, C., Wells, S.J., Hartmann, W.L., Godden, S.M., Carrier, J., 2009. Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Prev. Vet. Med.*, 88, 128–137.

Firestone, S.M., Schemann, K.A., Toribio, J-A.L.M.L., Ward, M.P., Dhand, N.K., 2011. A case-control study of risk factors for equine influenza spread onto horse premises during the 2007 epidemic in Australia. *Prev. Vet. Med.*, 10, 53–63.

Firth, C., Firth, C., Bhat, M., Firth, M.A., Williams, S.H., Frye, M.J., Simmonds, P., Conte, J.M., Ng, J., Garcia, J., Bhuvana, N.P., Lee, B., Che, X., Quan, P.-L., W. Ian Lipkin, W.I., 2014. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio*, 5, e01933-14.

FLI. Statistik zur BVD-Bekämpfung in Deutschland, 2018. <https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IVD/BVD-Statistik2011-2017.pdf>.

Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M., 2004. Structure, genome organization, and infectious cycles. *Principles of virology*. 2^o ed. Washington DC. USA: ASM Press. 811-812.

Friedgut, O., Rotenberg, D., Brenner, J., Yehuda, S., Paz, R., Alpert, N., Aviram, A., Yadin, H., Grummer, B., 2011. Description of the first acute bovine diarrhoea virus-2 outbreak in Israel. *Vet. J.*, 189, 108–110.

Frössling, J., Nöremark, M., 2016. Differing perceptions - Swedish farmers' views of Infectious disease control. *Vet. Med. Sci.*, 2(1), 54–68.

Frössling, J., Wahlstrom, H., Agren, E.C.C., Cameron, A., Lindberg, A., Lewerin, S.S., 2013. Surveillance system sensitivities and probability of freedom from *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* infection in Swedish cattle. *Prev. Vet. Med.*, 108, 47–62.

Fujimura, Y., Owen, R.L., 1996. M cells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infect. Agents Dis.*, 5, 144–56.

Fulton, R. W., Purdy, C. W., Confer, A. W., Saliki, J. T., Loan, R. W., Briggs, R. E., Burge, L. J., 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can. J. Vet. Res.*, 64, 151–159.

Fulton, R.W., 2015. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus on control by vaccination. *Anim. Health Res. Rev.*, 16, 40-54.

Fulton, R. W., D'offay, J. M., Eberle, R., Moeller, R.B., Campen, H. V., O'toole, D., Chase, C., Miller, M.M., Sprowls, R., Nydam, D.V., 2015. Bovine herpesvirus-1: evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine*, 33, 549-558.

Fux, R., Wolf, G., 2013. Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: A pitfall for BVD eradication programs?. *Vet. Microbiol.*, 161, 13–19.

Gaede, W., Kenkies, S., Wolf, G., Gehrman, B., 2004. Experiences with the control of BVDV excretion with semen of transiently infected bulls according to Council directive 2003/43/EC. In: Proceedings of the Second European Symposium on BVDV Control. Porto, Portugal, p. 59.

Garcia, A. B., Shalloo, L., 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J. Dairy Sci.*, 98(8), 5019-5039.

Gard, J.A., Givens, M.D., Marley, M.S.D., Galik, P.K. Riddell, K.P., Edmondson, M.A., Rodning, S.P., 2010. Intrauterine inoculation of seronegative heifers with bovine viral diarrhoea virus concurrent with transfer of in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 73, 1009. 1017.

Garvey, M., 2018. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open Vet. J.*, 8, 172-181.

Gates, M.C., Woolhoues, M.E.J., Gunn, G.J., Humpry, R.W., 2013. Relative associations of cattle movements, local spread, and biosecurity with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) seropositivity in beef and dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 12: 285-295.

Gavin, W.G., Porter, C.A., Hawkins, N., Schofield, M.J., Pollock, J.M., 2018. Johne's disease: a successful eradication programme in a dairy goat herd. *Vet. Rec.*, 182, 483.

Geraghty, T., O'Neill, R., More, S. J., O'Grady, L., 2012. Dynamics of individual animal bovine herpes virus-1 antibody status on 9 commercial dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, 93, 143-149.

Geraghty, T., Graham, D.A., Mullaney, P., More, S.J., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev. Vet. Med.*, 116: 1-11.

Gerlach, G.F., 2002. Paratuberculosis: the pathogen and routes of infection. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 109: 504-506.

Gethmann, J., Homeier, T., Holsteg, M., Schirrmeyer, H., Sasserath, M., Hoffmann, B., Beer, M., Conraths, F. J., 2015. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon*, 1, e00019.

Giammarioli, M., Ceglie, L., Rossi, E., Bazzucchi, M., Casciari, C., Petrini, S., De Mia, G.M., 2015. Increased genetic diversity of BVDV-1, recent findings and implications thereof. *Virus Genes*, 50, 147–151.

Giangaspero, M., Harasawa, R., Weber, L., Belloli, A., 2008. Taxonomic and epidemiological aspect of the bovine viral diarrhoea virus 2 through the observation of the secondary structures in the 50 genomic untranslated region. *Vet. Ital.*, 44, 319–345.

Givens, M.D., Heath, A.M., Brock, K.V., Brodersen, B.W., Carson, R.L., Stringfellow, D.A., 2003. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 64, 428-434.

Givens, M.D., 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, 66, 648-654.

Givens, M.D., Marley, M.S., 2013. Immunology of chronic BVDV infections. *Biologicals*, 41, 26-30.

Givens, M.D., Newcomer, B.W., 2015. Perspective on BVDV control programs. *Anim. Health Res.Rev.*, 16(1), 78-82.

Godfroid, J., Boelaert, F., Heier, A., Clavareau, C., Wellemans, V., Desmecht, M., Roels, S., Walravens, K., 2000. First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet. Microbiol.*, 77, 283-90.

González, A.M., Arnaiz, I., Eiras, C., Camino, F., Sanjuán, M.L., Yus, E., Diéguez, F.J., 2014. Monitoring the bulk milk antibody response to bovine viral diarrhoea in dairy herds vaccinated with inactivated vaccines. *J. Dairy Sci.*, 97, 3684-3688.

González, A.M., Arnaiz, I., Yus, E., Eiras, C., Sanjuán, M.L., Diéguez, F.J., 2014. Evaluation of long-term antibody responses to two inactivated bovine viral diarrhoeavirus (BVDV). *Vet. J.*, 199, 424-428.

Gonzalez-Garcia, M.A., Arenas-Casas, A., Carbonero-Martinez, A., Borge-Rodriguez, C., Garcia-Bocanegra, I., Maldonado, J.L., Gomez-Pacheco, J.M., Perea-Remujo, J.A., 2009. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus type 1 (BHV1) infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (south of Spain). *Spanish J. Agric. Res.*, 7, 550-554.

González, J., Pérez, V., Juste, A., Reyes, L.E., García, J.F., 2004. Valor predictivo de las técnicas serológicas para la detección de bajas en explotaciones bovinas afectadas de paratuberculosis. Congreso Internacional de Medicina Bovina (Anembe). Gijón, España.

Graat, E.A., de Jong, M.C., Frankena, K., Franken, P., 2001. Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Vet. Microbiol.*, 79, 193-208.

Graham, D.A., 2013. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Vet. J.*, 66, 15.

Graham, D.A., Clegg, T.A., Thulke, H.-H., O'Sullivan, P., McGrath, G., More, S.J., 2016. Quantifying the risk of spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) between contiguous herds in Ireland. *Prev.Vet. Med.*, Apr1; 126, 30-8.

Grange, J.M., 1990. The mycobacteria. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Ed. M.T. Parker and B.I. Duerden, 8th ed., vol. 2, pp. 74-97.

Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Moennig, V., 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, 31, 113-118.

Grissett, G. P., White, B. J., Larson, R. L., 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *J. Vet. Int. Med.*, 29, 770–780.

Groenendaal, H., Nielen, M., Hesselink, J. W., 2003. Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. *Prev. Vet. Med.*, 60, 69–90.

Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clinics North Am. – Food Anim. Pract.*, 20, 5–19.

Grooms, D.L., Baker, J.C., Ames, T.R., 2014. Diseases caused by bovine virus diarrhoea. In Smith B (2014) *Large Animal Internal Medicine*, 5th edn., St. Louis: Mosby, pp. 791–797.

Guarino, H., Nunez, A., Repiso, M.V., Gil, A., Dargatz, D.A., 2008. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev. Vet. Med.*, 85, 34–40.

Guevara, J.C., Grünwaldt, E.G., 2012. Status of Beef Cattle Production in Argentina over the Last Decade and Its Prospects, *Livestock Production*, Dr Khalid Javed (ed.), InTech, London. Available at: <https://www.intechopen.com/books/livestock-production/status-of-beef-cattle-production-in-argentina-over-the-last-decade-and-its-prospects> (Accessed 15 January 2018).

Gunn, G.J., Hefferman, C., Hall, M., McLeod, A., Hovi, M., 2008. Measuring and comparing constraints to improved biosecurity amongst GB farmers, veterinarians and the auxiliary industries. *Prev. Vet. Med.*, 84, 310–323.

Gunn, G. J., Stott, A. W., Humphry, R. W., 2004. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. *Vet. J.*, 167, 143–149.

Gunn, H. M., 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 132, 584–585.

Gupta, S., Singh, S.V., Singh, M., Chaubey, K.K., Karthik, K., Bathia, A.K., Kuman, N., Dhama, K., 2019. Vaccine approaches for the 'therapeutic management' of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in domestic livestock. *Vet. Quart.*, Vol.39, No.1, 143–152.

Gustafson, L.L., Gustafson, D.H., Antognoli, M.C., Remmenga, M.D., 2012. Integrating expert judgment in veterinary epidemiology: Example guidance for disease freedom surveillance. *Prev. Vet. Med.*, 109, 1–9.

Hage, J. J., Schukken, Y.H., Dijkstra, T.H., Barkema, H.W., van Valkengoed, P.H.R., Wentink, G.H., 1998. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev. Vet. Med.*, 34, 97–106.

Hage, J.J., Schukken, Y.H., Barkema, H.W., Benedictus, G., Rijsewijk, F.A., Wentink, G.H., 1996. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet. Microbiol.*, 53, 169–180.

Hall, J., Wapenaar, W., 2012. Opinions and practices of veterinarians and dairy farmers towards herd health management in the UK. *Vet. Rec.*, 170, 441.

Hartman, A., vanWuijckhuise, L., Frankena, K., Franken, P., Wever, P., deWit, J., Kramps, J., 1997. Within-herd BHV-1 prevalence prediction from an ELISA on bulk milk. *Vet. Rec.*, 140, 484–485.

Hause, B.M., Collin, E.A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R.A., Gauger, P.C., Clement, T., Fang, Y., Anderson, G., 2015. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J. Gen. Virol.*, 9610, 2994–2998.

Havelaar, A. H., van Rosse, F., Bucura, C., Toetenel, M. A., Haagsma, J.A., Kurowicka, D., Heesterbeek, J.A.P., Speybroeck, N., Langelaar, M.F.M., van der Giessen, J.W.B., Cooke, R.M., Braks, M. A. H., 2010. Prioritizing emerging zoonoses in the Netherlands. *PLoS One*, 5(11), e13965.

Heffernan, C., Nielsen, L., Thomson, K., Gunn, G., 2008. An exploration of the drivers to bio-security collective action among a sample of UK cattle and sheep farmers. *Prev. Vet. Med.*, 87, 358-372.

Heikkila, J., 2011. Economics of biosecurity across levels of decision-making: A review. *Agro. Sustain. Develop.*, 31, 119–138.

Heinz, F.X., Collet, M.S., Purcell, R.H., 2000. Genus Pestivirus. New York, NY: Academic Press.

Hemmatzadeh, F., Amini, F., 2009. Dot-blot enzyme immunoassay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies. *Vet. Arhiv*, 79, 343–350.

Herman, L., De Jonghe, V., Dumon, I., Grijspeerdt, K., Naydenski, H., D'Haese, E., 2006. Clumping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and feces and growth activation after milk heating. Manning y Nielsen editores. Proc. 8th Int. Coll. Paratub. pp. 304-310.

Hertig, C., Pauli, U., Zanoni, R., Peterhans, E., 1991. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 26, 65–76.

Hessman, B.E., Sjeklocha, D.B., Fulton, R.W., Ridpath, J.F., Johson, B.J., McElroy, D.R., 2009. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in a starter feedlot. *Am. J. Vet. Res.*, 70, 73–85.

Hill, F.I., Reichel, M.P., Tisdall, D.J., 2010. Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. *Vet. Microbiol.*, 142, 87–89

Hoe, F.G., Ruegg, P.L., 2006. Opinions and practices of Wisconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being. *J. Dairy Sci.*, 89, 2297-2308.

Hore, D.E., McQueen, D.S., McKinna, D.A., 1971. Infection of dairy cattle with *Mycobacterium johnei* in a partially vaccinated herd. *Aust. Vet. J.*, 47 (9), 421–423.

Horner, G.W., Orr, D.M., 1993. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine pestivirus. *NZ. Vet. J.*, 41, 123–125.

Houe, H., 2005. Risk assessment. In S.M. Goyal, J. F. Ridpath (Eds.), *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management and control* (pp. 35–64). Ames, IA: Blackwell Publishing.

Houe, H., (2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, 31, 137–143.

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

Houe, H., Meyling, A., 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Me.*, 11, 9–16.

Houe, H., Baker, J.C., Maes, R.K., Wuryastuti, H., Wasito, R., Ruegg, P. L., Lloyd, J. W., 1995. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 7, 321–326.

Houe, H., 1993. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Prev. Vet. Med.*, 15, 275–283.

Houe, H., Lindberg, A., Moennig, V., 2006. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diag. Inv.*, 18, 427–436.

Humblet, M.-F., Vandeputte, S., Albert, A., Gosset, C., Kirschvink, N., Haubruge, E., Fecher-Bourgeois, F., Pastoret, P-P., Saegerman, C., 2012. Multidisciplinary and evidence based method for prioritizing diseases of food producing animals and zoonoses. *Emerg. Infect. Dis.*, 18 (4).

Jacevicius, E., Šalomskas, A., Milius, J., Petkevicius, S., Mockeliunas, R., Jaceviciene, I., Lelešius, R., Pridotkas, G., 2008. Prevalence and control measures of infectious bovine rhinotracheitis in Lithuania. *Anim. Health, Food Hygiene, Jelgava, Latvia*, 14 November, pp. 49–53.

Jackova, A., Novackova, M., Pelletier, C., Audeval, C., Gueneau, E., Haffar, A., Petit, E., Rehby, L., Vilcek, S., 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1, Typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.*, 32, 7–11.

Jones, C., 2019. Bovine herpesvirus 1 counteracts immune responses and immune-surveillance to enhance pathogenesis and virus transmission. *Front. Immunol.*, 10, 1008.

Jones, C., Chowdhury, S., 2008. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim. Health Res. Rev.*, 8, 187-205.

Jones, L.R., Zandomeni, R., Weber, E.L., 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.*, 81, 367–375.

Jungersen, G., Mikkelsen, H., Grell, S.N., 2012. Use of the johnin PPD interferon- gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 148, 48–54.

Juste, R.A., Garrido, J.M., Adúriz, G., 2000. Paratuberculosis: El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Bovis*, 93, 13-28.

Kaashoek, M.J., Van Oirschot, J.T., 1996. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. *Vet. Microbiol.*, 53, 191–197.

Kaiser, V., Nebel, L., Schüpbach-Regula, G., Zanoni, R. G., Schweizer, M., 2017. Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhoea (BVD) eradication program in Switzerland. *BMC Vet. Res.*, 13, 21.

Kalis, C. H. J., Collins, M. T., Barkema, H. W., Hesselink, J. W., 2004. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet. Med.*, 65, 189–204.

Kalis, C. H. J., Barkema, H. W., Hesselink, J. W., Van Maanen, C., Collins, M. T., 2002. Evaluation of two absorbed ELISAs and a Complement Fixation Test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 14, 219–224.

Kampa, J., Alenius, S., Emanuelson, U., Chanlun, A., Aiumlamai, S., 2009. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: Self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. *Vet.J.*, 182, 223–230.

Kapil, S., Walz, P. H., Wilkerson, M., Minocha, H., 2005. Immunity and Immunosuppression. In S. M. Goyal, & J. F. Ridpath (Eds.), *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management and control* (pp. 157–170). Ames, IA: Blackwell Publishing.

Kaufmann, S.H., 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 129–63.

Kennedy, A. E., O’Doherty, E.F., Byrne, N., O’Mahony, J., E. M. Kennedy, E.M., Sayers. R.G., 2014. A survey of management practices on Irish dairy farms with emphasis on risk factors for Johne’s disease transmission. *Ir. Vet. J.*, 67, 27.

Kennedy, D. J., 2001. Control of paratuberculosis. *Bull. Internat. Dairy Federat.*, 364, 29–45.

Kennedy, D. J., 2011. International efforts at paratuberculosis control. *Vet. Clinics North Am.: Food Anim. Practice*, 27, 647–654.

Kennedy, J.A., 2006. Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 229, 1472–1474.

Kerkhofs, P., Renjifo, X., Toussaint, J.F., Letellier, C., Vanopdenbosch, E., Wellemans, G., 2003. Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. *Vet. Rec.*, 152, 681–686.

Khan, F., Vorster, J.H., van Vuuren, M., Mapham, P., 2011. Evaluation of the effects of long-term storage of bovine ear notch samples on the ability of 2 diagnostic assays to identify calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 82, 18–23.

Khodakaram-Tafti, A., Farjanikish, G.H., 2017. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *In. J. Vet. Res.*, Vol.18, No. 3, 60, 154-163.

Khol, J. L., Beran, V., Kralik, P., Trckova, M., Pavlik, I., & Baumgartner, W., 2010. Grass silage contaminated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP): a possible source of paratuberculosis infection in ruminants. *Veterinarni Medicina*, 55(5), 225-232.

Kim, S.G., Dubovi, E.J., 2003. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31, 103–106.

Kirkland, P.D.; Read, A.J.; Frost, M.J.; Finlaison, D.S., 2015. Bungowannah virus a probable new species of pestivirus what have we found in the last 10 years? *Anim. Health Res. Rev.*, 16, 60–63.

Kirkland, P. D., McGowan, M.R., Mackintosh, S.G., A., Moyle, A., 1997. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, 140, 124-127.

Kirkland, P., Makintosh, S., Moyle, A., 1994. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, 135, 527-529.

Kopecna, M., Trcka, I., Lamka, J., Moravkova, M., Koubek, P., Heroldova, M., Mrlik, V., Kralova, A., Pavlik, I., 2008. The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. *Vet. Med.-Czech*, 53, 420–426.

Kramps, J.A., Banks, M., Beer, M., Kerkhofs, P., Perrin, M., Wellenberg, G.J., Van Oirschot, J.T., 2004. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet. Microbiol.*, 102, 169-181.

Kristensen, E., Jakobsen, E. B., 2011. Danish dairy farmers' perception of biosecurity. *Prev. Vet. Med.*, 99,122-129.

Kristensen, E., Jakobsen, E.B., 2011. Challenging the myth of the irrational dairyfarmer; understanding decision-making related to herd health. *N Z. Vet. J.*, 59(1), 1-7.

Kudahl, A. B., Nielsen, S. S., Ostergaard, S., 2011. Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 94, 3824-3834.

Kuhne, S., Schroeder, C., Holmquist, G., Wolf, G., Horner, S., Brem, G., Ballagi, A., 2005. Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – Testing tissue samples derived from ear tagging using an E-rns capture ELISA. *J. Vet. Med. Series, B* 52, 272-277.

Kumari, R.R., Kumar, R., Kumari, S., Kumar, P., Kumar, M., 2019. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR): A silent problem causing infertility in cross-bred cattle. *Vet. Helpline India*; May 24, 7, 1-9.

Künzler, R., Torgerson, P., Keller, S., Wittenbrink, M., Stephan, R., Knubben-Schweizer, G., Berchtold, B., Meylan, M., 2014. Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Swiss dairy and beef herds. *BMC Vet. Res.* 10, 132.

Kuo, C.J., Bell, H., Hsieh, C.L., Ptak, C.P., Chang, Y.F., 2012. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 287, 1892-1902.

Kupferschmied, H.U., Kihm, U., Bachmann, P., Muller, K.H., Ackermann, M., 1986. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*, 25, 439-443.

Kuster K., Cousin M-E., Jemmi, T., Schüpbach-Regula, G., Magouras, I., 2015. Expert opinion on the perceived effectiveness and importance of on-farm biosecurity measures for cattle and swine farms in Switzerland. *PloS One*, 10, e0144533.

Laanen, M., Maes, D., Hendriksen, C., Gelaude, P., De Vliegher, S., 2014. Pig, cattle and poultry farmers with a known interest in research have comparable perspectives on disease prevention and on-farm biosecurity. *Prev.Vet.Med.*, 115, 1-9.

Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., Dewulf, J., 2013. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Vet. J.*, 198, 508-512.

Lackner, T., Muller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A.E., Tautz, N., 2004. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.*, 78, 10765–10775.

Lam, T., Jansen, J., Van Den Bourne, B. H. P., Renes, R. J., Hogeveen, H., 2011. What veterinarians need to know about communication to optimize their role as advisors on udder health in dairy herds. *NZ.Vet.J.*, 59, 8–15.

Lambeth, C., Reddacliff, L.A., Windsor, P., Abbott, K.A., McGregor, H., Whittington, R.J., 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust.Vet.J.*, 82, 504-508.

Lambot, M., Douart, A., Joris, E., Letesson, J.J., Pastoret, P.P., 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.*, 78, 1041–1047.

Lambot, M., Joris, E., Douart, A., Lyaku, J., Letesson, J.J., Pastoret, P.P., 1998. Evidence for biotype-specific effects of bovine viral diarrhoea virus on biological responses in acutely infected calves. *J. Gen. Virol.*, 79, 27-30.

Lamont, E.A., O’grady, S.M., Davis, W.C., Eckstein, T., Sreevatsan, S., 2012. Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1beta release and macrophage transepithelial migration. *Infect .Immun.*, 80, 3225–3235.

Lamont, E.A., Talaat, A.M., Coussens, P.M., Bannantine, J.P., Grohn, Y.T., Katani, R., Li, L.L., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2014. Screening of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutants for attenuation in a bovine monocyte-derived macrophage model. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 4, 87.

Lang-Ree, J.R.; Vatn, T., Kommisrud, E., Loken, T., 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet. Rec.*, 135, 412-413.

Lanyon, S.R., Hill, F.I., Reichel, M.P., Brownlie, J., 2014. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet. J.*, 199, 201-209.

Larghi, M., 2018. Comparative study in the control of bovine viral diarrhoea. *Anim. Health Res.Reviews*, 19, 125-133.

Larson R.L., Brodersen, B.W., Grotelueschen, D.M., Hunsaker, B.D., Burdett, W., Brock, K.V., Fulton, R.W., Goehl, D.R., Sprowls, R.W., Kennedy, J.A., Loneragan, G.H., Dargatz, D.A., 2005. Considerations for bovine viral diarrhoea (BVD) testing. *Bov.Pract.*, 39, 96–100.

Laurin, E. L., Chaffer, M., McClure, J. T., McKenna, S. L., Keefe, G. P., 2015. The association of detection method, season, and lactation stage on identification of fecal shedding in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 98, 211–220.

Lavers, C., Barkema, H. W., Dohoo, I. R., McKenna, S. L. B., Keefe, G.P., 2014. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds and association with within-herd prevalence. *J. Dairy Sci.*, 97, 299–309.

Lavilla-Núñez, D.D., Ferre, I., Ortega-Mora, L.M., 2017. Bioseguridad en explotaciones bovinas de leche: implantación de un plan, riesgos y medidas. *Producc. Anim.*, 300, 48-58.

Lefrancois, .LH., Pujol, C., Bodier, C.C., Teixeira-Gomez, A.P., Drobecq, H., Rosso, M.L., Raze, D., Alves Dias, A., Hugot, J.-P., Chacon, O., Barletta, R.G., Locht, C., Vidal Pessolani, M.C., Biet, F., 2011. Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease. *Microbes Infect.*, 13,585–94.

Leite, F., Sylte, M.J., O'Brien, S., Schultz, R., Peek, S., van Reeth, K., Czuprynski, C.J., 2002. Effect of experimental infection of cattle with bovine herpesvirus (BHV-1) on the *ex vivo* interaction of bovine leukocytes with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84, 97–110.

Lemaire, M., Meyer, G., Baranowski, E., Schynts, F., Wellemans, G., Kerkhofs, P., Thiry, E., 2000. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4233–4238.

Levings, R.L., 2012. Emerging and exotic zoonotic disease preparedness and response in the United States – Coordination of the animal health component. *Zoonoses Public Health*, 59, 80–94.

Levings, R.L. & Roth, J.A., 2013a. Immunity to Bovine Herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Anim.Health Res.Rev.*, 14, 88-102.

Levings, R.L., Roth, J.A., 2013b. Immunity to Bovine Herpesvirus 1: II. Adaptive immunity and vaccinology. *Anim.Health Res.Rev.*, 14, 103-123.

Lewerin, S.S., Österberg, J., Alenius, S., Elvander, M., Fellström, C., Travén, M., Wallgren, P., Waller, K.P., Jacobsen, M., 2015. Risk assessment as a tool for improving external biosecurity at farm level. *BMC Vet. Res.*, 11,71.

Lindberg, A., Berriatua, E., Fourichon, C., Mintiens, K., Houe, H., 2001. Epidemiology and risks. EU thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). BVDV control position paper. <https://www.afbini.gov.uk/publications/eu-thematic-networkcontrol-bovine-viraldiarrhoea-virus-bvdv> (Accessed 21 october 2019)

Lindberg, A., 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet. Quart.*, 25, 1–16.

Lindberg, A., Houe, H., 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.*, 72, 55–73, discussion 215–219.

Lindberg, A., Berriatua, E., Fourichon, C., Mintiens, K., Houe, H., 2006a. Position paper: epidemiology and risks. EU Thematic Network on BVDV control. Available at <https://www.afbini.gov.uk/articles/final-report-bvdvcontrol-europe> (Accessed 30 December 2017).

Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G.J., Houe, H., Moenning, V., Saatkamp, H.W., Sandvik, T., Valle, P.S., 2006. Perspectives in BVDV control in Europe-today and in the future. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 25, 961-979.

Lugton, I., 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell. Biol.*, 77, 364–372.

Lunardi, M., Headley, S.A., Lisboa, J.A., Amude, A.M., Alfieri, A.A., 2008. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res. Vet. Sci.*, 85, 599–604.

Lynch, R., Kenny, D.A., Parr, M.H., Barrett, D., Kelly A.K., Crosson, P., 2018. Modelling the impact of bovine herpesvirus-1 seropositivity on the technical and economic performance of a pastoral-based suckler beef system. *J. Agric. Sci.*, 1-8.

Magombedze, G., Ngonghala, C.N., Lanzas, C., 2013. Evaluation of the "Iceberg Phenomenon" in John's disease through Mathematical Modelling. *PLoS One*, 8 (10), 1-11.

Makoschey, B., Zehle, H.H., Bussacchini, M., Valla, G., Palfi, V., Foldi, J., 2007. Efficacy of a live bovine herpesvirus type 1 marker vaccine under field conditions in three countries. *Vet. Rec.*, 161, 295–298.

Manual de la OIE, 2004a. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. Capítulo 2.3.5. In: Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccine 2004, 5ta edición, Office International des Epizooties.

Marcé, C., Ezanno, P., Weber, M.F., Seegers, H., Pfeiffer, D.U., Fourichon, C., 2010. Invited review: modeling within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.*, 93, 4455–4470.

Marcé, C., Ezanno, P., Seegers, H., Pfeiffer, D.U., Fourichon, C., 2011. Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study. *Vet. Res.*, 42, 36.

Mariner, J.C., House, J.A., Mebus, C.A., Sollod, A.E., Chibeu, D., Jones, B.A., Roeder, P.L., Admassu, B., Van't Klooster, G.G., 2012. Rinderpest eradication: Appropriate technology and social innovations. *Science*, 337, 1309–1312.

Mars, M.H., de Jong, M.C., Franken, P., van Oirschot, J.T., 2001. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, 19, 1924–1930.

Marschik, T., Obritzhauser, W., Wagner, P., Richter, V., Mayerhofer, M., Egger-Danner, C., Käsboher, A., Pinior, B., 2018. A cost-benefit analysis and the potential trade effects of the bovine viral diarrhoea eradication programme in Styria, Austria. *Vet. J.*, 231, 19–29.

Marshall, D.J., Moxley, R.A., Kelling, C.L., 1996. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.*, 33, 311–318.

Martin, A., 2016. Infectious bovine rhinotracheitis: causes, signs and control options. Available online: Veterinary Times. Video VT46.35. (accessed on 12 December 2020).

Martínez, S., Yus, E., Sanjuán, M.L., Camino, F., Eiras, C., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2016. Bovine herpesvirus 1: within-herd seroprevalence and antibody levels in bulk-tank milk. *Rev. Sci. Tech.*, 35, 899-904.

Mato, I., Yus, E., Pesqueira, N., Factor, C., Camino, F., Sanjuán, M.L., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2017. A retrospective cohort study on the association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among offspring and their dams in Holstein cows. *BerlMünchTierärztlWochenschr.*, 130, 128-135.

Mato, I., Pesqueira, N., Factor, C., Sanjuan, M. L., Yus, E., Fouz, R., Arnaiz, I., Camino, F., Diéguez, F. J., 2015. Effect of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection status on culling and calving difficulty in dairy cattle. *Livest. Sci.*, 177, 151-158.

Mato, I., Pesqueira, N., Factor, C., Camino, F., Sanjuán, M.L., Yus, E., Diéguez, F.J. 2017a. Effect of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* serostatus on carcass weight and conformation and fat cover scores. *Spanish J. Agric. Res.*, 1, e0502.

Mato, I., Yus, E., Pesqueira, N., Factor, C., Camino, F., Sanjuán, M.L., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2017b. A retrospective cohort study on the association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among offspring and their dams in Holstein cows. *BerlMünchTierärztlWochenschr.*, 130, 128-135.

Maunsell, F., Donovan, G. A., 2008. Biosecurity and risk management for dairy replacements. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice*, 24, 155–190.

Maye, D., Dibden, J., Higgins, V., Potter, C., 2012. Governing biosecurity in a neoliberal world: Comparative perspectives from Australia and the United Kingdom. *Environ. Planning*, 44, 150–168.

McAloon, C.G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H.W., Whyte, P., More, S.J., O’Grady, L., Green, M.J., Doherty, M.L., 2019. A review of paratuberculosis in dairy herds - Part 1: Epidemiology. *Vet. J.*, 246, 59-65.

McAloon, C.G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H.C., Whyte, P., More, S.J., O'Grady, L., Green, M.J., Doherty, M.L., 2019. A review of paratuberculosis in dairy herds - Part Two: On-farm control. *Vet. J.*, 246, 54-58.

McAloon, C.G., Doherty, M.L., Whyte, P., O'Grady, L., More, S.J., Messam, L.L.M., Good, M., Mullaney, P., Strain, S., Green, M.J., 2016b. Bayesian estimation of prevalence of paratuberculosis in dairy herds enrolled in a voluntary Johne's Disease Control Programme in Ireland. *Prev.Vet.Med.*, 128, 95–100.

McAloon, C. G., Doherty, M. L., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Citer, L., and Green, M. J., 2017a. Relative importance of herd-level risk factors for probability of infection with paratuberculosis in Irish dairy herds. *J. Dairy.Sci.*, 100, 9245-9257.

McAloon, C.G., Whyte, P., More, S.J., Green, M.J., O'Grady, L., García, A.B., Doherty, L.M., 2015. The effect of paratuberculosis on milk yield – A systematic review and meta-analysis. *J.Dairy.Sci.*, 99,1449-1460.

McGee, Z.A., Wittler, R.G., Goode, R. H., Charache, P., 1971. Wall-defective microbial variants: terminology and experimental design. *J. Infec. Dis.*, 123, 433-438.

McIntyre, K. M., Setzkorn, C., Hepworth, P. J., Morand, S., Morse, A. P; Baylis, M., 2014. A quantitative prioritisation of human and domestic animal pathogens in Europe. *PLoS One*, 9(8), e103529.

McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., Barkema, H.W., 2006. Johne's disease in Canada. Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Canadian Veterinary Journal – Rev. Vét. Can.*, 47, 1089–1099.

Mee, J.F., Geraghty, T., O'Neill, R., More, S.J., 2012. Bioexclusion of diseases from dairy and beef farms: Risks of introducing infectious agents and risk reduction. *Vet. J.*, 194,143-150.

Mignon, B., Dubuisson, J., Baranowski, E., Koromyslov, I., Ernst, E., Boulanger, D., Waxweiler, S., Pastoret, P.P., 1991. A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Meth.*, 35, 177–188.

Mignon, B., Waxweiler, S., Thiry, E., Boulanger, D., Dubuisson, J., Pastoret, P.P., 1992. Epidemiologic evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhea pestivirus antigens in field blood-samples of persistently infected cattle. *J. Virol. Meth.*, 40, 85–93.

Miller, J. M., 1991. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet.Med.*, 86, 95-98.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), 2018. Panel situación sector lácteo España. Available:http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/pizarraabril18_tcm30444377.pdfhttp://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/pizarraabril18_tcm30-444377.pdf. (Accessed on 2 December 2019).

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), 2018. Panel situación sector lácteo España. https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/resultados_provisionales_may2019_bovino_webmapa_tcm30-514025.pdf. (Accessed on 2 December 2019).

Mitchel, A., Bourn, D., Mawdsley, J., Wint, W., Clifton-Hadley, R., Gilbert, M., 2005. Characteristics of cattle movements in Britain – an analysis of records from the Cattle Tracing System. *Anim. Sci.*, 80, 265–273.

Moeller, R. B. Jr., Adaska, J., Reynolds, J., Blanchard, P.C., 2013. Systemic bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 25, 136–141.

Moennig, V., Becher, P., 2018. Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*. 7, 29.

Moennig, V., Brownlie, J., 2001. *Vaccines and vaccination strategies. EU thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). BVDV control position paper*. Available at: <https://www.afbini.gov.uk/publications/eu-thematic-network-control-bovine-viral-diarrhoea-virus-bvdv> (accessed on 14 September 2018).

Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.*, 25,131–7.

Moore, D.A., Merryman, M.L., Hartman, M.L., Klingborg, D.J., 2008. Comparison of published recommendations regarding biosecurity practices for various production animal species and classes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 233, 249-256.

Mortier, R. A. R., Barkema, H. W., Bystrom, J. M., Illanes, O., Orsel, K., Wolf, R., Atkins, De Buck, J., 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet. Res.*, 44, 94.

Mortier, R.A.R., Barkema, H.W., De Buck, J., 2015. Susceptibility to and diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy calves: A review. *Prev. Vet. Med.*, 121 (3-4), 189-198.

Moya, S., Allepuz, A., Benavides, B., Tirado, F., Espluga, J., Casal, J., Yus, E., Diéguez, J., 2018. Veterinarios y granjeros: investigando experiencia y opiniones sobre la implementación de medidas de bioseguridad en granjas de leche. Congreso Internacional de Medicina Bovina Anembe; Vigo, pp 334.

Moya, S., Tirado, F., Espluga, J., Ciaravino, G., Armengol, R., Diéguez, F.J., Yus, E., Benavides, B., Casal, J., Allepuz, A., 2019. Dairy farmers' decision-making to implement biosecurity measures: A study of psychosocial factors. *Transbound. Emerg. Dis.*, 00, 1–13.

Moya, S., Chan, K.W., Hinchliffe, S., Buller, H., Espluga, J., Benavides, B., Diéguez, F.J., Yus, E., Ciaravino, G., Casal, J., Tirado, F., Allepuz, A., 2021. Influence on the implementation of biosecurity measures in dairy cattle farms: Communication between veterinarians and dairy farmers. *Prev. Vet. Med.*, 190, 105329.

Muller-Doblies, D., Arquint, A., Schaller, P., Heegaard, P.M., Hilbe, M., Albin, S., Abril, C., Tobler, K., Ehrensperger, F., Peterhans, E., Ackermann, M., Metzler, A., 2004. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 11, 302–312.

Muñoz-Zanzi, C.A., Johnson, W.O., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 2000. Pooled sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 195–203.

Murphy, N., 2012. Economic Impacts and Eradication of Bovine Viral Diarrhoea with special regards to Ireland. Thesis. Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Dep. of State Vet. Med. and Agr. Econ., Budapest, 44.

Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C., Studdert, M. J., 1999. *Veterinary Virology*, Third Edition.

Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E., 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.*, 38, 181-209.

Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., 2006. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J. Gen. Virol.*, 87, 2149–2154.

Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., Sakoda, Y., 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 36, 135–139.

Nagel-Alne, G. E., Asheim, L. J., Hardaker, J. B., Sølverød, L., Lindheim, D., Valle, P. S., 2014. The Norwegian Healthier Goats programme—a financial cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.*, 114, 96–105.

Nampanya, S., Suon, S., Rast, L., Windsor, P.A., 2012. Improvement in small holder farmer knowledge of cattle production, health and biosecurity in Southern Cambodia between 2008 and 2010. *Transbound. Emerg. Dis.*, 59, 117–127.

Nandi, S. Kumar, M., Manohar, M., Chauchan, R.S., 2009. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim. Health Res. Rev.*, 10, 85-98.

Nardelli, S., Farina, G., Lucchini, R., Valorz, C., Moresco, A., Dal Zotto, R., Costanzi, C., 2008. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Prev. Vet. Med.*, 85, 68–80.

Narita, M., Kimura, K., Tanimura, N., Arai, S., Tsuboi, T., Katsuda, K., 2000. Immunohistochemical characterisation of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *J.Comp. Pathol.*, 123,126–134.

National Research Council. 2003. Economic implications of Johne's disease. Pages 9–103 in *Diagnosis and Control of Johne's Disease*. National Academy Press, Washington, DC.

Negrón, M., Raizman, E.A., Pogranichniy, R., Hilton, W.M., Levy, M., 2011. Survey on management practices related to the prevention and control of bovine viral diarrhoea virus on dairy farms in Indiana, United States. *Prev.Vet.Med.*, 99,130-135.

Neill, J.D., 2013. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41, 2–7.

Nerlich, B., Wright, N., 2006. Biosecurity and insecurity: the interaction between policy and ritual during the foot and mouth crisis. *Environ.Values* 15, 441–462.

Nettleton, P.F., Entrican, G., 1995. Ruminant pestiviruses. *British Vet. J.*, 151, 615–642.

Nettleton, P., Russell, G., 2017. Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In Practice*, June, volume 39, 255-272.

Newcomer, B.W., Chamorro, M.F., Walz, P.H., 2017. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 206, 78–83.

Newcomer, B.W., Cofield, L.C., Walz, P.H., Givens, M.D., 2017. Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Prev.Vet.Med.*, 138, 1-8.

Newcomer, B.W., Walz, P.H., Givens, M.D., Wilson, A.E., 2015. Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis. *Theriogenology*, 83, 360-365.

Nielsen, S.S., Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.*, 129, 217–235.

Nielsen, S.S., Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet.Med.*, 88,1-14.

Nielsen, S. S., Jepsen, O. R., Aagaard, K., 2007. Control programme for paratuberculosis in Denmark. *Bull. Intern. Dairy Fed.* 410/207: Proc. 1st ParaTB Forum, pp. 23–29.

Nielsen, S. S., Toft, N., 2011. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 94, 1849–1857.

Nielsen, S., 2009. Programmes on paratuberculosis in Europe. In: Proceedings of the 10th international colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis: International Association for Paratuberculosis, p. 101–108.

Niskanen, R., Lindberg, A., 2003. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet. J.*, 165, 125–130.

Noordegraaf, A. V., Jalvingh, A.W., Jong, M.C.M., Franken, P., Dijkhuizen, A.A., 2000. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulations. *Prev. Vet. Med.*, 44, 21-42.

Noordegraaf, A.V., Buijtels, J.A., Dijkhuizen, A.A., Franken, P., Stegeman, J.A., Verhoeff, J., 1998. An epidemiological and economic simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in The Netherlands. *Prev.Vet. Med.*, 36, 219–238.

Nöremark, M., Frössling, J., Lewerin, S.S., 2010. Application of routines that contribute to on-farm biosecurity as reported by Swedish livestock farmers. *Transbound. Emerg. Dis.*, 57, 225–36.

Nöremark, M., Lindberg, A., Vagsholm, I., Lewerin, S.S., 2009. Disease awareness, information retrieval and change in biosecurity routines among pig farmers in association with the first PRRS outbreak in Sweden. *Prev.Vet.Med.*, 90, 1–9.

Nöremark, M., Lewerin, S.S., 2014. On-farm biosecurity as perceived by professionals visiting Swedish farms. *Acta Vet. Scand.*, 56, 28.

Nugent, G., Whitford, E.J., Hunnam, J.C., Wilson, P.R., Cross, M.L., de Lisle, G.W., 2011. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in wildlife on three deer farms with a history of Johne's disease. *NZ. Vet. J.*, 59, 293–298.

Nuotio, L., Neuvonen, E., Hyytiäinen, M., 2007. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet. Scand.*, 49, 3.

Nylin, B., Stroger, U., Ronsholt, L., 2000. A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 47, 91–105.

Obando, C. A. R., 1994. Problemas Respiratorios, entéricos y reproductivos en ganado bovino, ocasionados por virus. *Fonaiap Divulga*, 45, 1-7.

O'Connor, A.M., Sorden, S.D., Apley, M.D., 2005. Association between the existence of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus and commingling on pen morbidity in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 66, 2130–2134.

Odeón, A.C., 2016. Control del virus de la Diarrea Viral Bovina. Grupo de Sanidad Animal de la EEA Balcarce. INTA.

O'Doherty, E., Berry, D.P., O'Grady, L., Sayers, R., 2014. Management practices as risk factors for the presence of bulk milk antibodies to *Salmonella*, *Neospora caninum* and *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in Irish dairy herds. *Animals*, 8(6), 1010-1019.

OIE – World Organisation for Animal Health, 2017. Bovine Viral Diarrhoea. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. Available at <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (Accessed 1 November 2017).

Ott, S. L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.*, 40, 179–192.

Ózsvári, L., Bíró, O., Illés, B. Cs., 2001. Quantification of losses caused by bovine viral diarrhoea and mucosal disease. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 123,(9), 555-560.

Park, H.-T., Yoo, H.S., 2016. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 5, 108-116.

Patel, J.R., 2005. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. *Vet. J.*, 169, 404–416.

Paton, D.J., Goodey, R., Brockman, S., Wood, L., 1989. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDv. *Vet. rec.*, 124, 63-64.

Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C., Drew, T.W., 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.*, 142, 385–391.

Patton, J., 2012. The economics of recycled cows and extended lactations. <http://www.teagasc.ie/publications/2012/1581/index.asp>. (Accessed 24 June 2018).

Pedreira, M., Gómez-Villamandos, J.C., Rialde, M.A., Molina, V., Sanchez-Cordon, P.J., 2012. Characterisation of apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1. *J. Comp. Pathol.*, 146, 30–39.

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

Pesqueira, N. 2017. Infecciones cuasadas por *Mycobacterium* subsp. paratuberculosis en explotaciones bovinas lecheras: impacto sobre parámetros de calidad de leche e índices reproductivos, análisis en leche de tanque y valoración de las medidas de bioseguridad. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Pesqueira, N., Factor, C., Mato, i., Sanjuán, M.L., Macias, L., Eiras, C., Arnaiz, I., Camino, F., Yus, E., Diéguez, F.J., 2015. Associations between *Mycobacterium* paratuberculosis sero-status, milk quality parameters, and reproduction in dairy cows. *BerlMünchTerärztlWochenschr.*, 128, 370-375.

Pesqueira, N., Yus, E., Factor, C., Mato, I., Sanjuán, M.L., Eiras, C., Arnaiz, I., Diéguez, F.J., 2017. *Short communication*: Correlation between within-herd antibody-prevalence and bulk tank milk antibody levels to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* using 2 commercial immunoassays. *J Dairy Sci.*, 100, 7544-7548.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., Schweizer, M., 2010. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.*, 41, 44.

Peterhans, E., Schweizer, M., 2010. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. *Vet. Microbiol.*, 142, 18–25.

Peterhans, E., Schweizer, M., 2013. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, 41, 39–51.

Peterson, R., 2010. A phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus subtypes in diagnosis samples from cattle in Pennsylvania. Master of Science. Pennsylvania State University.

Pidone, C.L., Galosi, C.M., Etcheverrigaray, M. E., 1999. Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Vet.*, 19(112), 40-50.

Pierce, E.S., 2018. Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis...and colorectal cancer? *Infect. Agent. Cancer.*, 13, 1.

Pillars, R. D., Grooms, D. L., Gardiner, D. C., Kaneene, J. B., 2011. Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 98, 10–18.

Pinior, B., Firth, C.L., Ritcher, V., Lebl, K., Trauffler, M., Dzieciol, M., Hutter, S.E., Burgstaller, J., Obritzhauser, W., Winter, P., Käsbohrer, A., 2017. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev.Vet.Med.*,137, 77-92.

Pinior, B., García, S., Minviel, J.J., Raboisson, D., 2019. Epidemiological factors and mitigation measures influencing production losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. A meta-analysis. *Transbound. Emerg. Dis.*, 66, 2426-2439.

Plain, K.M., Marsh, I.B., Waldron, A.M., Galea, F., Whittington, A.-M., Saunders, V.F., Begg, D.J., de Silva, K., Purdie, A.C., Whittington, R.J., 2014. High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 745–757.

Porquet Garanto, L., 2012. The bulk milk sampling: Only valuable with an increased detectability. In: Workshop 6. IBR Eradication in the EU: Success and Pitfalls of the Strategies, Current Status. The Bulk Tank as an Innovative Way of Monitoring IBR. Proceedings of the 27th World Buiatrics Congress, Lisbon, Portugal, 8 June 2012, p. 5.

Postel, A.; Schmeiser, S.; Oguzoglu, T.C.; Indenbirken, D.; Alawi, M.; Fischer, N.; Grundhoff, A.; Becher, P., 2015. Close relationship of ruminant pestiviruses and classical swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 21, 668–672.

Pradhan, A. K., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Wolfgang, D. R., Hovingh, E., Nelen, K. A., Smith, J.M., Whitlock, R.H., Fyock, T., Ladely, S., Fedorka-Cray, P.J., and Schukken, Y.H., 2009. Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.*, 92, 1811-1825.

Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., Heim, D., 2011. Bovine viral diarrhea (BVD) eradication in Switzerland—Experiences of the first two years. *Prev. Vet. Med.*, 99, 112-121.

Pritchard, K., Wapenaar, W., Brennan, M.L., 2015. Cattle veterinarians' awareness and understanding of biosecurity. *Vet. Rec.*, May 23.

Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R., Wall, E., 2017. Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 100, 679–690.

Pritchard, G. C., Banks, M., Vernon, R.E., 2003. Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in a dairy herd of high health status. *Vet. Rec.*, 153, 113–117.

Puerto-Parada, M., Arango-Sabogal, J.C., Paré, J., Doré, E., Côté, G., Wellemans, V., Buczinski, S., Roy, J.P., Labrecque O., and Fecteau, G., 2018. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* herd status in Québec dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 152, 74-80.

Quinn, H.E., Windsor, P.A., Kirkland, P.D., Ellis, T.J., 2004. An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Aust. Vet. J.*, 82, 99–101.

Raaperi, K., Bougeard, S., Aleksejev, A., Orro, T., Viltrop, A., 2012a. Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Vet. Scand.*, 54, 4.

Raaperi, K., Aleksejev, A., Orro, T., Viltrop, A., 2012. Dynamics of bovine herpesvirus type 1 infection in Estonian dairy herds with and without a control programme. *Vet.Rec.*, 171, 99.

Raaperi, K., Orro, T., Viltrop, A., 2015. Effect of vaccination against bovine herpesvirus 1 with inactivated gE-negative marker vaccines on the health of dairy cattle herds. *Prev. Vet. Med.*, 118, 467-476.

Raaperi, K., Orro, T., Viltrop, A., 2014. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet. J.*, sep, 201(3), 249-56.

Raaperi, K., Nurmoja, I., Orro, T., Viltrop, A., 2010. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. *Prev. Vet. Med.*, 96, 74–81.

Radwan, G.S., Brock, K.V., Hogan, J.S., Smith, K.L., 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 44, 77–91.

Raizman, E. A., Fetrow, J.P., Wells, S.J., 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 92, 4929–4936.

Rangel, S.J., Paré, J., Doré, E., Arango, J.C., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Fairbrother, J.M., Roy, S.P., Wellemans, V., Fecteau, G., 2015. A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis (MAP) into dairy herds. *Can.Vet.J.*, 56, 169-177.

Ratianaiah, G., Zinniel, K.Z., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Gröhn, Y.T., Collins, M.T., Barletta, R.G., 2017. Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium Avium* subsp. *Paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Front. Vet. Sci.*, nov.6, 4, 187.

Rauff, Y., Moore, D.A., Sisco, W.M., 1998. Evaluation of the results of a survey of dairy producers on dairy herd biosecurity and vaccination against bovine viral diarrhoea. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 209, 1618-1622.

Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on Transmissible Animal Diseases and Amending and Repealing Certain Acts in the Area of Animal Health ("Animal Health Law").

Renault, V., Damiaans, B., Sarrazin, S., Humblet, M.-F., Dewulf, J., Saegerman, C., 2018. Biosecurity practices in Belgian cattle farming: Level of implementation, constraints and weaknesses. *Transbound.Emerg. Dis.*, 65, 1246-1261.

Renault, V., Damiaans, B., Sarrazin, S., Humblet, M.F., Lomba, M., Ribbens, S., Riocreux, F., Koenen, F., Cassart, d., Dewulf, J., Saegerman, C., 2018. Classification of adult cattle infections diseases: A first step towards prioritization of biosecurity measures. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65, 1991-2005.

Renault, V., Humblet, M.F., Moons, V., Bosquet, G., Gauthier, B., Cebrián, L.M., Casal, J., Saegerman, C., 2018. Rural veterinarian's perception and practices in terms of biosecurity across three European countries. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65, 183–193.

Renshaw, R.W., Ray, R., Dubovi, E.J., 2000. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 184–186.

Richardson, E. K. B., and More, S. J., 2009. Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. *Ir. Vet. J.* 62, 526.

Richter, V., Lebl K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Käsbohrer, A., Pinior, B., 2017. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. J.*, 220, 80-87.

Ridpath, J.F., Bolin. S.R., 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molec. Cell. Probes*, 12, 101–106.

Ridpath, J.F., 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, 41, 14–19

Rikula, U., Nutio, L., Laamanen, I., Sihvonen, L., 2008. Transmission of bovine viral diarrhoea virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions. *Vet. Rec.*, 162, 79-82.

Ritter, C., Roth, J.J., Kastelic, J.P., Adams, C.L. Barkema, H.W., 2016. Dairy farmer's perceptions toward the implementation of on-farms Johne's disease prevention and control strategies. *J. Dairy Sci.*, 99, 9114-9125.

Ritter, C., Jansen, J., Roche, S., Kelton, D.F., Adams, C.L., Orsel, K., Erskine, R.J., Benedictus, G., Lam, T.J.G.M., Barkema, H.W., 2017. Invited review: Determinants of farmers' adoption of management-based strategies for infectious disease prevention and control. *J. Dairy Sci.*, vol.100, 5, 3329-3347.

Robinson, K. E., Meers, J., Gravel, J. L., McCarthy, F. M., Mahony, T. J., 2008. The essential and non-essential genes of bovine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.*, 89, 2851-2863

Roche, S.M., Kelton, D.F., Meechan, M., Von Massow, M., Jones-Bitton, A., 2019. Exploring dairy producers and veterinarian's perception of barriers and motivators to adopting on-farm management practices for Johne's disease control in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci.*, 102, 4476-4488.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Rivera-Arroyo, B., Martínez-López, B., de las Heras, A.I., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 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, 11.

Roeder, P.L., Taylor, W.P., 2005. Mass vaccination and herd immunity: cattle and buffalo. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 26, 253–263.

Rojo, S., Tapiolas Verdera, M., Osoro, K., Ortega Mora, L.M., 2016. Bioseguridad en explotaciones de vaca nodriza. *Mundo Ganadero*, Septiembre/Octubre, 16-22.

Rossiter, C. A., Burhans, W. S., 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice*, 12, 383–415.

Sahlström, L., Virtanen, T., Kyrrö, J., Lyytikäinen, T., 2014. Biosecurity on Finnish cattle, pig and sheep farms—results from a questionnaire. *Prev. Vet. Med.*, 117, 59-67.

Saliki, J.T., Dubovi, E.J., 2004. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. North Am. – Food Anim. Practice*, 20, 69–83.

Saliki, J.T., Fulton, R.W., Hull, S.R., Dubovi, E.J., 1997. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 803–807.

Saliki, J.T., Huchzermeier, R., Dubovi, E.J., 2000. Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. In: House, J.A., Kocan, K.M., Gibbs, E.P.J. (Eds.), *Tropical Veterinary Diseases – Control and Prevention in the Context of the New World Order*, vol. 916, 358–363.

Sanderson, M.W., Dargatz, D.A., Garry, F.B., 2000. Biosecurity practices of beef cow-calf producers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 217, 185–189.

Sandvik, T., Krogsrud, J., 1995. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood-samples. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 7, 65–71.

Santman-Berends, I. M.G A., Mars, M. H., Van Duijn, L., Van den Broek, K.W H., Van Schaik, G., 2017. A quantitative risk-analysis for introduction of bovine viral diarrhoea virus in the Netherlands through cattle imports. *Prev. Vet. Med.*, 146, 103–113.

Sarrazin, S., Cay, A.B., Laureyns, J., Dewulf, J., 2014. A survey on biosecurity and management practices in selected Belgian cattle farms. *Prev. Vet. Med.*, 117, 129-139.

Sayers, R.G., Good, M., Sayers, G.P., 2014. A survey of biosecurity-related practices, opinions and communications across dairy farm veterinarians and advisors. *Vet. J.*, 190, 261-269.

Sayers, R.G., 2014. Biosecurity, bovine viral diarrhoea virus (BVDv), and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1): Epidemiological investigation in Irish Dairy herds. Doctoral Thesis. University of Limerick. Ireland.

Sayers, R.G., Sayers, G.P., Mee, J.F., Good, M., Bermingham, M.L., Grant, J., Dillon, P.G., 2013. Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland. *Vet. J.*, 197; 259-267.

Sayers, R.G., Byrne, N., O'Doherty, E., Arkins, S., 2015. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, 100, 21-30.

Sayers, R.G., 2017. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 100: 1340-1352.

Sayers, R.G., Sayers, G.P., Mee, J.F., Good, M., Bermingham, M.L., Grant, J., Dillon, P., 2013. Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland. *Vet. J.*, 197, 259–267.

Sayers, R.G., 2016. The costs of IBR in Irish dairy herds. *Animal Health Ireland Bulletin*. Available: https://animalhealthireland.ie/?page_id=377. (Accessed on 15 december 2020).

Sayers, R.G., 2016. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 100:1340–1352

Scharnböck, B., Roch, F., -F., Ritcher, V., Funke, C., Firth, C. L., Obritzhauser, W., Baumgartner, W., Käsbohrer, A., Pinior, B., 2018. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Sci. Rep.*, 8, 14420.

Schoder, G., Mostl, K., Benetka, V., Baumgartner, W., 2004. Different outcome of intrauterine infection with bovine viral diarrhoea (BVD) virus in twin calves. *Vet. Rec.*, 154, 52–53.

Schweizer, M., Peterhans, E., 2014. Pestiviruses. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2, 141–163.

Schwyzer, M., Ackermann, M., 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 53, 17-29.

Scott, P., 2013. The challenges to improve farm animal welfare in the United Kingdom by reducing disease incidence with greater veterinary involvement on farm. *Animals*, 3, 629–646.

Scottish Government, 2016a. Economic report on Scottish agriculture. Available at <http://www.gov.scot/Resource/0050/00501417.pdf> (Accessed 27 November 2017).

Secott, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect. Immun.*, 69, 2075–82.

Secott, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect. Immun.*, 70, 2670–5.

Segura-Correa, J.C., Solorio-Rivera, J.L., Sanchez-Gil, L.G., 2010. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Tropical Anim.Health Prod.*, 42, 233–238.

Sergeant, E.S.G., McAloon, C.G., Tratalos, J.A., Citer, L.R., Graham, D.A., More, S.J., 2019. Evaluation of national surveillance methods for detection of Irish dairy herds infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J. Dairy Sci.*, 102, 2525-2538.

Serrano, M., Elguezabal, N., Sevilla, .IA., Geijo, M.V., Molina, E., Arrazuria, R., Urkizta, A., Jones, G.J., Vordermeier, M., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2017. Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: new alternatives against interference. *PLoS One*, 12(1), e0169735.

Shannon, A.D., Richards, S.G., Kirkland, P.D., Moyle, A., 1991. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J. Virol. Methods*, 34, 1–12.

Sharon, K.P., Duff, G.C., Paterson, J.A., Dailey, J.W., Carroll, J.A., Marceau, E.A., 2013. Case study: effects of timing of a modified-live respiratory viral vaccination on performance, feed intake, antibody titer response, and febrile response of beef heifers. *Prof. Anim. Sci.*, 29, 307–312.

Shephard, R.W., Williams, S.H., Beckett, S.D., 2016. Farm economic impacts of bovine Johne's disease in endemically infected Australian dairy herds. *Aust. Vet. J.*, 94(7), 232–239.

Shortall, O., Ruston, A., Green, M., Brennan, M., Wapenaar, W., Kaler, J., 2013. Broken biosecurity? Veterinarians' framing of biosecurity on dairy farms in England. *Prev. Vet. Med.*, 132, 20-31.

Shortall, O., Green, M., Brennan, M., Wapenaar, W., Kaler, J., 2017. Exploring expert opinion on the practicality and effectiveness of biosecurity measures on dairy farms in the United Kingdom using choice modeling. *J.Dairy Sci.*, Vol.100, N° 3.

Sibley, R., 2010. Biosecurity in the dairy herd. *In Practice*, 32, 274-280.

Simmonds, P., Becher, P., Colle, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Meyers, G., Monath, T., Pletnev, A., Rice, C.M., Stiansny, K., Thie, H.J., Weiner, A., Bukhet, J., 2011. Flaviviridae. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB and Lefkowitz EJ (eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, pp. 1003–1020

Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar-Ares, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Prev. Vet. Med.*, 110, 223–231.

Singh, S.V., Singh, P.K., Kumar, N., Gupta, S., Chaubey, K.K., Singh, B., Srivastav, A., Yadav, S., Dhama, K., 2015. Evaluation of goat based 'indigenous vaccine' against bovine Johne's disease in endemically infected native cattle herds. *Indian J. Exp. Bio.*, 53, 16–24.

Singh, S. V., Singh, A. V., Kumar, A., Singh, P. K., Deb, R., Verma, A. K., Kumar, A., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2013. Survival mechanisms of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within host species and in the environment—A review. *Nat. Sci.*, 5, 710-723.

Singh, S.V., Gupta, S., Chaubey, K.K., Bhusan, S., Rawat, K.D., Kumar, N., Tiwari, H.A., Chaturvedi, V., Sohal, J.S., Dhama, K., Hemati, Z., 2017. Therapeutic management of incurable paratuberculosis using 'Indigenous Vaccine' in Goatherds, endemically infected with Johne's disease. *Int. J. Pharmacol.*, 13, 145–155.

Smith, D.R., Grotelueschen, D.M., 2004. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. Food Anim.: Food Anim.Pract.*, 20, 131-149.

Smith, R. L., Strawderman, R. L., Schukken, Y. H., Wells, S. J., Pradhan, A. K., Espejo, L.A., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Smith, J.M., Wolfgang, D.R., and Gröhn, Y.T., 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 93, 3513-3524.

Smith, R. L., Schukken, Y. H., Pradhan, A. K., Smith, J. M., Whitlock, R. H., Van Kessel, J. S., Wolfgang, D.R., Grohn, Y. T., 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy. *Prev. Vet. Med.*, oct.1,102 (1), 1-9.

Smith, R.L., Sanderson, M.W., Walz, P.H., Givens, M.D., 2008. Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. *J.Vet. Diagn. Inv.*, 20, 75–78.

Sorge, U. S., Lissemore, K., Godkin, A., Jansen, J., Hendrick, S., Wells, S., & Kelton, D. F., 2012. Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. *Can. Vet. J.*, 53(9), 963.

Spagnuolo-Weaver, M., Allan, G.M., Kennedy, S., Foster, J.C., Adair, B.M., 1997. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, 287-297.

Statham, J.M.E., Randall, L.V., Archer, S.C., 2015. Reduction in daily milk yield associated with subclinical bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Rec.*, 177, 339-342.

Sternberg Lewerin, S., Österberg, J., Alenius, S., Elvander, M., Fellström, C., Travén, M., Wallgren, P., Persson Waller, K., Jacobson, M., 2015. Risk assessment as a tool for improving external biosecurity at farm level. *BMC Vet.Res.*, 1, 171.

Stevenson, K., 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Vet. Res.*, 46(1), 64.

Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., Juan Ferré, L.de, Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G.F., Heron, I., Kopecna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J.M., Thibault, V.C., Willemsen, P., Zadocks, R., Griegh, A., 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.*, 9, 212.

Stoffregen, B., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Pohlenz, J., 2000. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet. Microbiol.*, 77, 157–162.

Stott, A. W., Humphry, R. W., Gunn, G. J., Higgins, I., Hennessy, T., O'Flaherty, J., Graham, D. A., 2012. Predicted costs and benefits of eradicating BVDV from Ireland. *Ir. Vet. J.*, 65, 12.

Stott, A.W., Gunn, G.J., 2008. Use of a benefit function to assess the relative investment potential of alternative farm animal disease prevention strategies. *Prev. Vet. Med.*, 84, 179–193.

Straub, O.C., 2001. Advances in BHV-1 (IBR) research, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108(10), 419-422.

Streeter, R. N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 1322-1324.

Strube, W., Auer, S., Block, W., Heinen, E., Kretzdorn, D., Rodenbach, C., Schmeer, N., 1996. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet. Microbiol.*, 53,181–189.

Sweeney, R., Collins, M., Koets, A., McGuirk, S., and Roussel, A., 2012. Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *J. Vet. Intern. Med.*, 26, 1239-1250.

Sweeney, R.W., Uzonna, J., Whitlock, R.H., Habecker, P.L., Chilton, P., Scott, P., 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res.Vet. Sci.*, 80, 253–259.

Szabara, A., Ózsari, L., 2014. Economic impacts, control and eradication of Bovine Viral Diarrhoea virus. In: Challenges for the Agricultural Sector in central and Eastern Europe. AgroiinformKiadó. Budapest, pp. 247-258.

Talafha, A.Q., Hirche, S.M., Ababneh, M.M., Al-Majali, A.M., Ababneh, M.M., 2009. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. *Trop.Anim. Health Prod.*, 41, 499-506.

Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., Thiry, E., 2006. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.*, 37, 169-190

Thiry, J., Tempesta, M., Camero, M., Tarsitano, E., Bellacicco, A. L., Thiry, E. y Buonavoglia, C., 2006b. A live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vet. Microbiol.*, 113, 303-308.

Thoen, C.O., Muscoplat, C.C., 1979. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174, 838-840.

Thomann, B., Tschopp, A., Magouras, I., Meylan, M., Schüpbach-Regula, G., Häslar, B., 2017. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. *Prev. Vet. Med.*, 145, 1–6 .

Thorel, M.F., Krichesvsky, M., Levy-Frebault, V.V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactindependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 254-260.

Thrusfield, M., 2007. *Veterinary epidemiology*. 3rd ed. Blackwell Science Ltd.

Thulke, H. H., Lange, M., Tratalos, J.A., Clegg, T.A., McGrath, G., O’Grady, L., O’Sullivan, P., Doherty, M.L., Graham, D.A., More, S.J., 2018. Eradicating BVD, reviewing Irish programme data and model predictions to support prospective decision making. *Prev. Vet. Med.*, 150, 151–161.

Thurmond, M. C., 2005. Virus transmission. In S. M. Goyal, & J. F. Ridpath (Eds.), *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management and control* (pp. 91–104). Ames, IA: Blackwell Publishing.

Tinsley, M., Lewis, F.I., Brülisauer, F., 2012. Network modeling of BVD transmission. *Vet. Res.*, 43, 11.

Tiwari, A., Vanleeuwen, J.A., Dohoo, I. R., Stryhn, H., Keefe, G.P., and Haddad, J.P., 2005. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet. Microbiol.*, 109(3-4), 147-158.

Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Weersink, A., 2008. Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Can. Vet. J.*, 49, 569–576.

Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., Barkema, H. W., 2006. Johne’s disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.*, 47, 874–882.

Toma, L., Stott, A.W., Hefernan, C., Ringrose, S., Gunn, G.J., 2013. Determinants of biosecurity behaviour of British cattle and sheep farmers - A behavioural economics analysis. *Prev. Vet. Med.*, 108, 321-333.

Tratalos, J., Thulke, H. H., Graham, D. A., Guelbenzu, M., More, S. J., 2018. Decision support beyond total savings-Eligibility and potential savings for individual participants from changes in the national surveillance strategy for bovine viral diarrhoea (BVD) in

Ireland. *Prev. Vet. Med.*, 155, 38-44.

Truylers, I.G.R., Mellor, D.J., Norquay, R., Gunn, G.J., Ellis, K.A., 2011. The eradication programme for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Orkney 2001-2008. *Cattle Practice*, 19, 47.

Van Campen, H., 2010. Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Vet. Microbiol.*, 14, 94-98.

Vanclay, F., Enticott, G., 2011. The role and functioning of cultural scripts in farming and agriculture. *Sociologia Ruralis*, 51, 256-271.

Van den Esker, M.H., Koets, P., 2019. Application of Transcriptomics to Enhance Early Diagnostics of Mycobacterial Infections, with an Emphasis on *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis. Vet. Sci.* 6, 59.

Van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2006. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.*, 113, 275-282.

Vaniddekinge, B., Vanwamel, J.L.B., Vangennip, H.G.P., Moormann, R.J.M., 1992. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.*, 30, 21-34.

Van Nieuwstadt, A. P., Verhoeff, J., 1983. Epidemiology of BHV 1 virus infections in dairy herds. *J. Hygiene (London)*, 91, 309-318.

Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A., Stegeman, J.A., 1996. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J. Biotech.*, 44, 75-81.

Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., Maris-Veldhuis, M.A., Weerdmeester, K., Rijsewijk, F.A., 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected

and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods*, 67, 23-34.

Van Schaik, G. Schukken, Y.H., Nielsen, M., Dijkhuizen, A.A., Beneditus, G., 2016. Epidemiology: Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: A case-control study. *Vet. Quart.*, 23, 71-76.

Van Schaik, G., Nielen, M., Dijkhuizen, A.A., 2001. An economic model for on-farm decision support of management to prevent infectious disease introduction into dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, 51, 289-305.

Van Schaik, G., Shoukri, M., Martin, S. W., Schukken, Y. H., Nielen, M., Hage, J. J., Dijkhuizen, A. A., 1999. Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of Dutch dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 82, 944–952

Van Winden, S., Stevens, K., Guitian, J., McGowan, M., 2005. Preliminary findings of asystematic review and expert opinion workshop on biosecurity on cattle farms in the UK. *Cattle Practice*, 13, 135–140.

Van Wuijckhuise, L., Bosch, J., Franken, P., Frankena, K., Elbers, A.R., 1998. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. *Vet.Rec.*, 142, 181–184.

Vanopdenbosch, E., Kerkhofs, P., 1997. Qualification and monitoring of IBR-free herds in the Belgian eradication programme. In: Franken, P. (Ed.), *IBR Control Programmes, Qualification and Monitoring of the IBR-free Status*, Maastricht, The Netherlands, 26–27 June 1997, pp. 10–11.

Vázquez, P., Garrido, J.M., Molina, E., Geijo, M.V., Gómez, N., Pérez, V., Sevilla, I.A., Alonso-Hearn, M., Cortes, A., Juste, R.A., 2014. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *Spanish J. Agricult.Res.*, 12, 1049-1060.

Veldhuis, A., Santman-Berends, I., Schauer, B., Mars, J., Waldeck, F., Staubach, C., van Schaik, G., 2017. Epidemiological performance and subsequent costs of different surveillance strategies to control bovine herpesvirus type 1 in dairy farms. *Prev.Vet.Med.*, 139, 105-114.

Verdugo, C., Toft, N., Nielsen, S.S., 2015. Within-and between-herd prevalence variation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among control programme herds in Denmark (2011–2013). *Prev. Vet. Med.*, 121, 282–287.

Vilar, A. L., Santos, C. S., Pimenta, C. L., Freitas, T. D., Brasil, A. W., Clementino, I. J., Alves, C.J., Bezerra, C.S., Riet-Correa, F., Oliveira, T.S., Azevedo, S.S., 2015. Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Prev. Vet. Med.*, 121, 49-55.

Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmannith, W., Vega, S., Scicluna, M.T., Paifi, V., 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arc. Virol.*, 146, 99–115.

Vilcek, S.; Ridpath, J.F.; Van Campen, H.; Cavender, J.L.; Warge, J, 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.*, 108, 187–193.

Villarroel, A., Dargatz, D.A., Lane, V.M., McCluskey, B.J., Salman, M.D., 2007. Suggested outline of potential critical control points for biosecurity and biocontainment on large dairy farms. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 230, 808-819.

Voges, H., Horner, G. W., Rowe, S., Wellenberg, G. J., 1999. Persistent bovine pestivirus infection of an immunocompetent bull. *Vet. Microbiol.*, 61, 165-175.

Voges, H., Young, S., Nash, M., 2006. Direct adverse effects of persistent BVDv infection in dairy heifers – A retrospective case control study. *Vet.Script*, 19, 22–25.

Waage, J.K., Mumford, J.D., 2008. Agricultural biosecurity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sci.*, 363, 863–876.

Waddell, L., Rajic, A., Stärk, K., McEwen, S.A., 2016. *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping of the existing evidence. *Prev. Vet. Med.*, 132, 32-48.

Waddell, L., Rajic, A., Stärk, K., McEwen, S.A., 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analysis of the evidence. *Epidemiol. Infect.*, 143, 3135-3157.

Waldner, C. L., 2005. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 90, 219–242

Waldner, C. L., Kennedy, R.I., 2008. Associations between health and productivity in cow-calf beef herds and persistent infection with bovine viral diarrhea virus, antibodies against bovine viral diarrhea virus, or antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 69, 916–927.

Walker, D.A., Smith, T.J., 2016. Nine pseudo R2 indices for binary logistic regression models. *J. Mod. Appl. Stat. Methods.*, 15, 848-854.

Wall, P.G., 2009. Essential veterinary education in food safety, food hygiene and biosecurity: A global perspective. *Revue Scientifique et Technique*; Office International des Epizooties 28, 493–501.

Weir, A., 2012. BVD - What does it do and what can you do about it. *Dairy NZ.*, 8, 15-20.

Wells, S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, C., Tavoranpanich, S., Petrini, K.R., Collins, J.E., Cernicchiaro, N., Whitlock, R.H., 2006. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13, 1125–1130.

Wells, S. J., Hartmann, W. L., Anderson, P. L., 2008. Evaluation of progress made by dairy and beef herds enrolled in the Minnesota Johne's Disease Control Program.

J. Am. Vet. Medi. Assoc., 233, 1920–1926.

Wentink, G. H., Dijkhuizen, A. A., 1990. Economic consequences of an infection with the bovine diarrhoea virus (BVD virus) in 15 dairy farms. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*. 115, 1031-1040.

Whist, A. C., Liland, K. H., Jonsson, M. E., Sæbø, S., Sviland, S., Østeras, O., Norström, M., Hopp, P., 2014. Designing a risk-based surveillance program for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Norwegian dairy herds using multivariate statistical process control analysis. *J. Dairy Sci.*, 97, 6835–6849.

Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, 77, 387–398.

Whitlock, R. H., Gardner, I.A., Mangold, B.L., Smith, J., Sweeney, R.W., Schukken, Y., Van Kessel, J., Hoving, E., Karns, J., Wolfgang, D., Fyock, T., 2006. Johne's disease: *Mycobacterium paratuberculosis* Super-shedders: Detection and contribution to passive shedding (false positive fecal culture). Page 286 in Proc. 39th Annu. Conv. Am. Assoc. Bovine Pract., Saint Paul, MN. Am. Assoc. Bovine Pract., Auburn, AL.

Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 12, 345-356.

Whittington, R., Donat, K., Weber, M.F., Kelton, D., Nielsen, S.S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J.L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M.A.S., Slana, I., Koehler, H., Singh, S.V., Yoo, H.S., Chávez-Gris, G., Goodridge, A., Ocepek, M., Garrido, J., Stevenson, K., Collins, M., Alonso, B., Cirone, K., Paolicchi, F., Gavey, L., Rahman, Md T., de Marchin, E., Van Praet, W., Bauman, C., Fecteau, G., McKenna, S., Salgado, M., Fernández-Silva, J., Dziejzinska, R., Echeverría, G., Seppänen, J., Virginie Thibault, V., Fridriksdottir, V., Derakhshandeh, A., Haghkhah, M., Ruocco, L., Kawaji, S., Momotani, E., Heuer, C., Norton, S., Cadmus, S., Agdestein, A., Kampen, A., Sztejn, J., Frössling, J., Schwan, E., Caldow, G., Strain, S., Carter, M., Wells, S., Munyeme, M., Wolf, R., Gurung, R., Verdugo, C., Fourichon, C., Yamamoto, T., Thapaliya, S., Di Labio, E., Ekgatat, M., Gil, A., Nuñez Alesandre, A., Piaggio, J., Suanes, A., de Waard, J.H., 2019. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.*, 15, 198.

Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(5), 2989-3004.

Willgert, K.J.E., Schroedle, B., Schwermer, H., 2011. Spatial analysis of bluetongue cases and vaccination of Swiss cattle in 2008 and 2009. *Geospat. Health*, 5, 227–37.

Wilhelmsen, C.L., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Cheville, N.F., Kluge, J.P., 1990. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in sixmonth-old calves. *Vet. Pathol.*, 27, 235–243.

Windsor, P.A., Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.*, 184, 37–44.

Wolf R., Barkema, H. W., De Buck, J., Orsel, K., 2016. Dairy farms testing positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* have poorer hygiene practices and are less cautious when purchasing cattle than test-negative herds. *J. Dairy Sci.*, 99, 4526-4536.

Woodbine, K. A., Medley, G. F., Moore, S. J., Ramirez Villaescusa, A. M., Mason, S., Green, L. A., 2009. A four-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south east England. *BMC Vet. Res.*, 5, 5.

Woolhouse, M.E., Haydon, D.T., Bundy, D.A., 1997. The design of veterinary vaccination programmes. *Vet. J.*, 153, 41–47.

Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Qi Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.*, 86, 10999–11012.

Xia, H.Y., Liu, L.H., Nordengrahn, A., Kiss, I., Merza, M., Eriksson, R., Blomberg, J., Belak, S., 2010. A microsphere-based immunoassay for rapid and sensitive detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies. *J. Virol. Methods*, 168, 18–21.

Xue, F., Zhu, Y.M, Li, J., Zhu, L.C., Ren, X.G., Feng, J.K., Shi, H.F., Gao, Y.R., 2010. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. *Vet. Microbiol.*, 143, 379–383.

Yan, L., Zhang, S., Pace, L., Wilson, F., Wan, H., Zhang, M., 2011. Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Inv.*, 23, 16–25.

Yarnall, M.J., Thrusfield, M., 2017. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: a systematic review of economic impact. *Vet. Rec.*, Doi: 10.1136/vr.104370.

Yesilbag, K., Alpay, G., Becher, P., 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viruses*, 9, 128.

Yesilbag, K., Förster, C., Bank-Wolf, B., Yilmaz, Z., Alkan, F., Ozkul, A., Burgu, I., Cedillo, R.S.; Thiel, H.J., König, M., 2008. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus BVDV isolates from Turkey, Identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.*, 130, 258–267.

Yesilbag, K., Förster, C., Ozyigit, M.O., Alpay, G., Tuncer, P., Thiel, H.J., König, M., 2014. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus BVDV isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet. Microbiol.*, 169, 42–49.

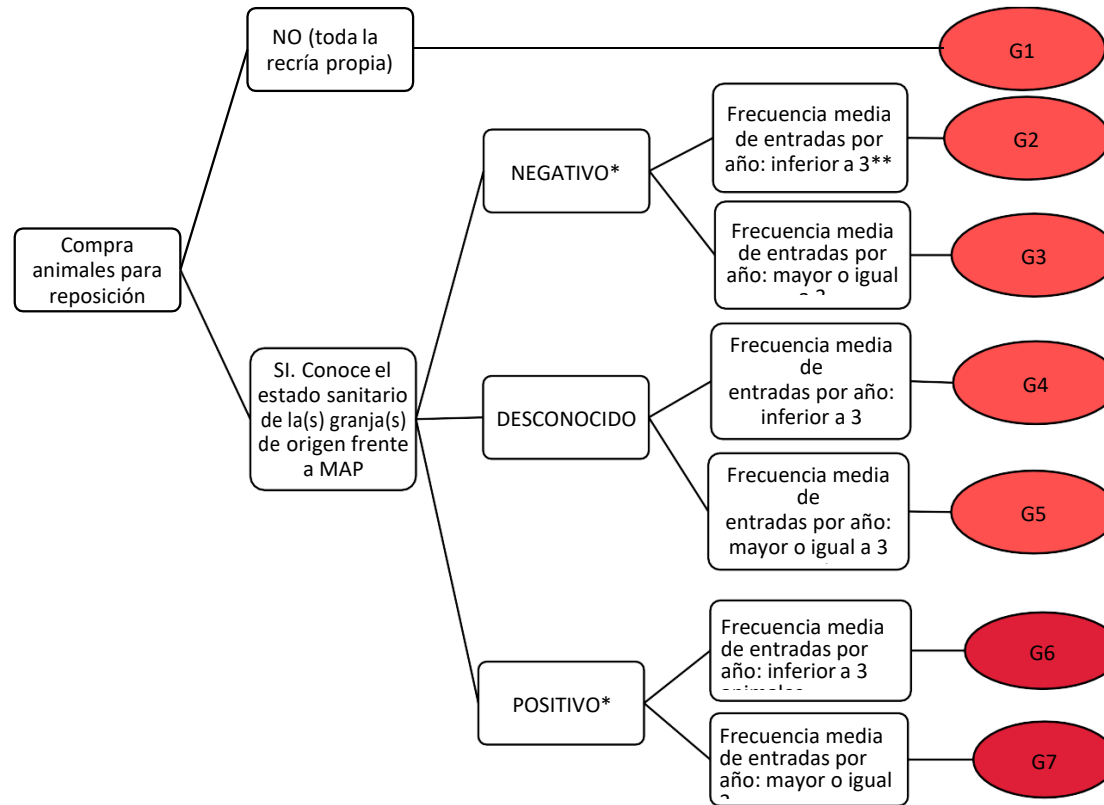
Yus, E., 2015. Bioseguridad en explotaciones de vacuno de leche. *Produc. Anim.*, 292, 40-44.

Zacarías, E. A. R., 2002. Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marco. Universidad del Perú. Lima- Perú.

Zhao, B., Collins, M.T., Czuprynski, C.J., 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with bovine monocytes. *Infect. Immun.*, 65, 1761–1766.

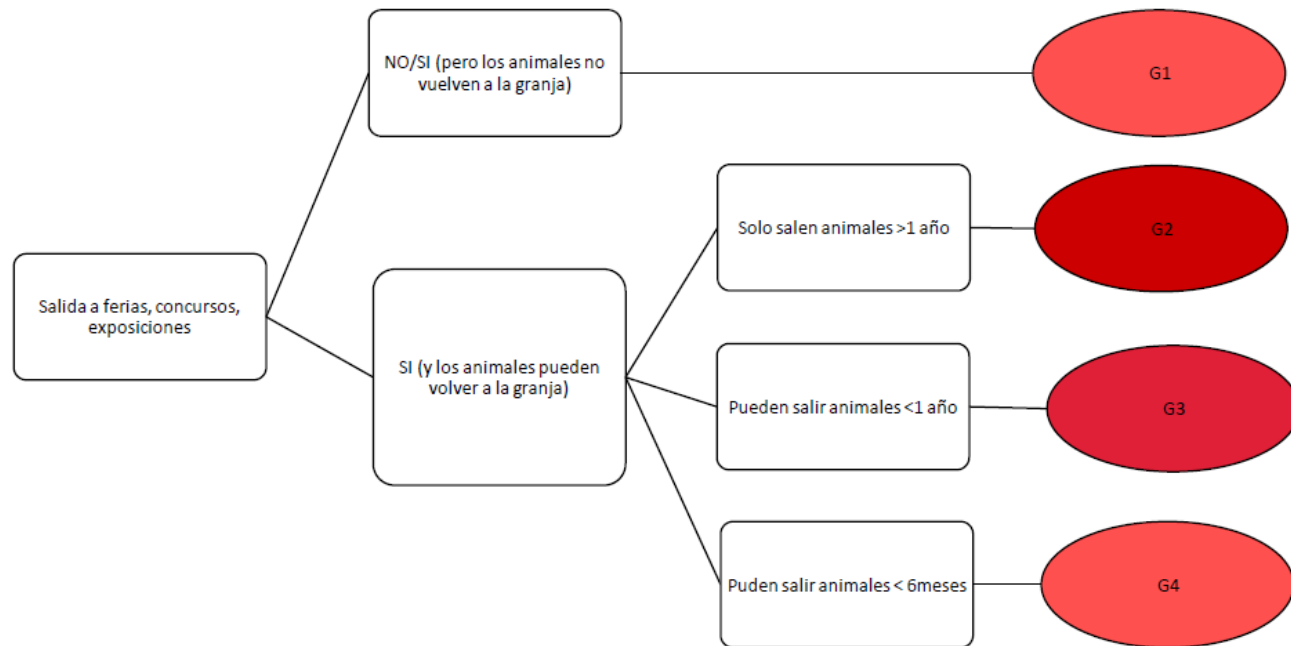
Zimmer, G.M., Van Maanen, C., De Goey, I., Brinkhof, J., Wentink, G.H., 2004. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. *Vet. Microbiol.*, 100, 145–149.

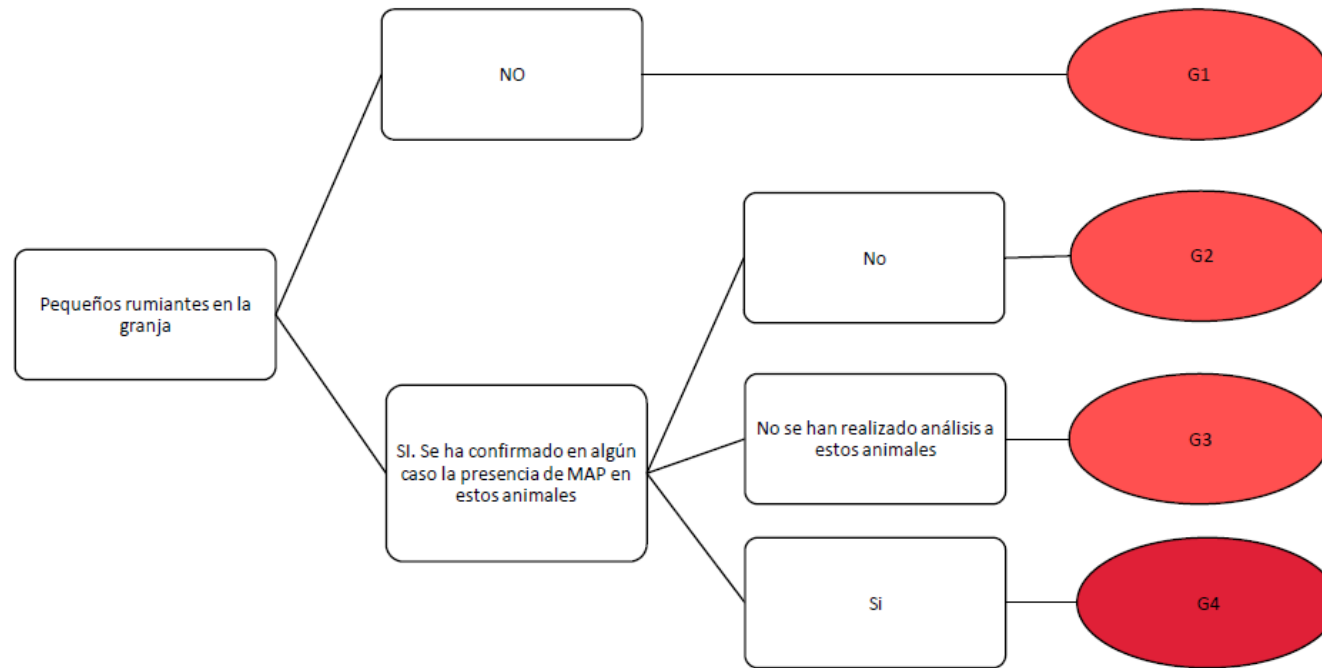
ANEXO 1. Árboles de decisión de factores de riesgo asociados a la introducción de MAP.

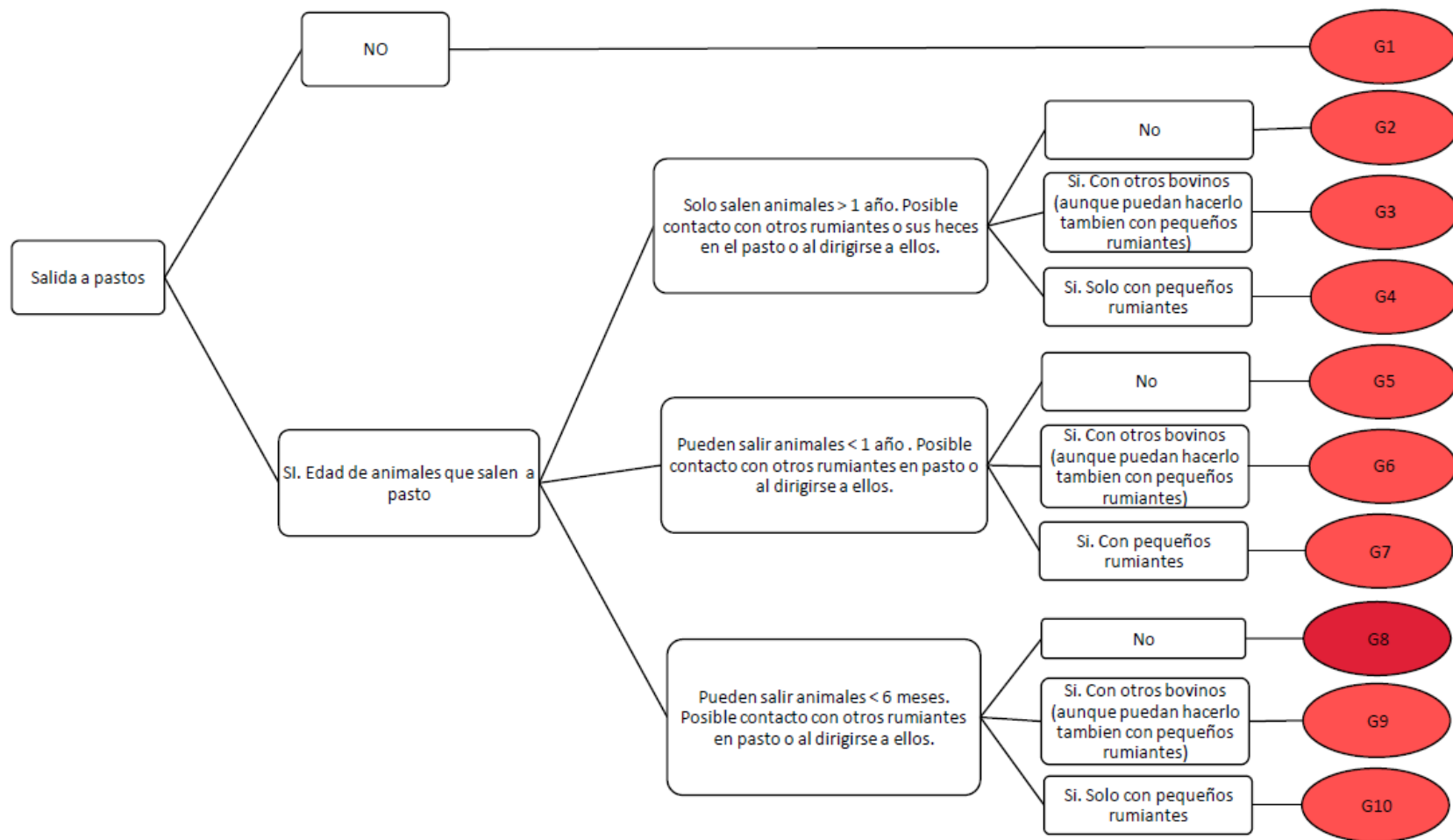


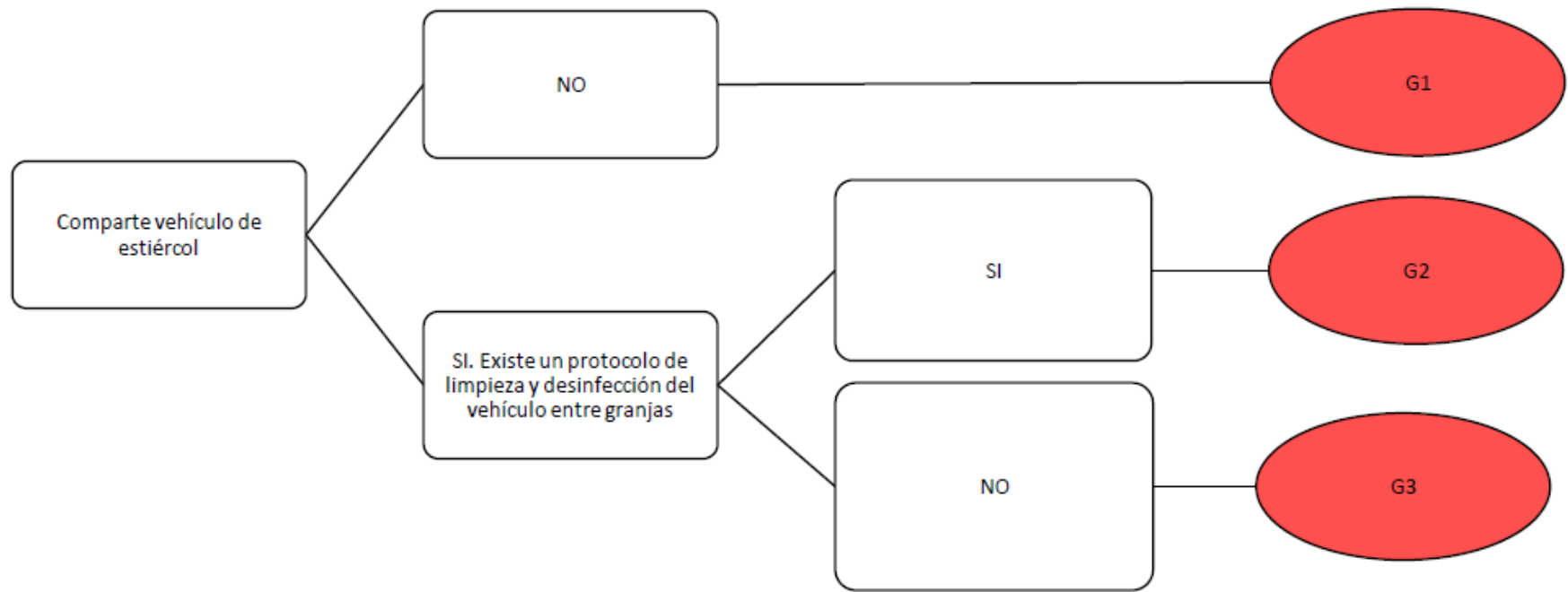
*Granja de origen que incluya al menos un programa de analíticas similar o superior al de ADSG. Positivo si ha confirmado MAP en alguna de las granjas y/o seropositividad superior al 15%. Negativo si todos los resultados a pruebas de anticuerpos y directas son negativas. Desconocido si no hay analíticas de la granja de origen o hay seropositividad inferior al 15% sin confirmación de la bacteria.

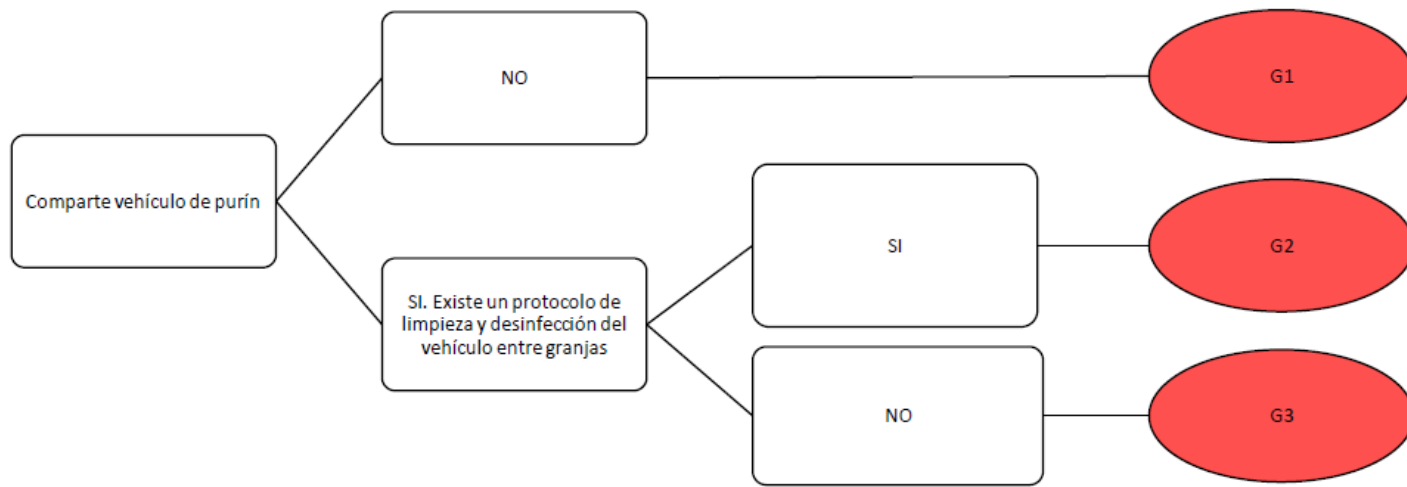
**Percentil 50: la mitad de los ganaderos que compran, adquieren menos de 3 animales por año y la otra mitad 3 o más

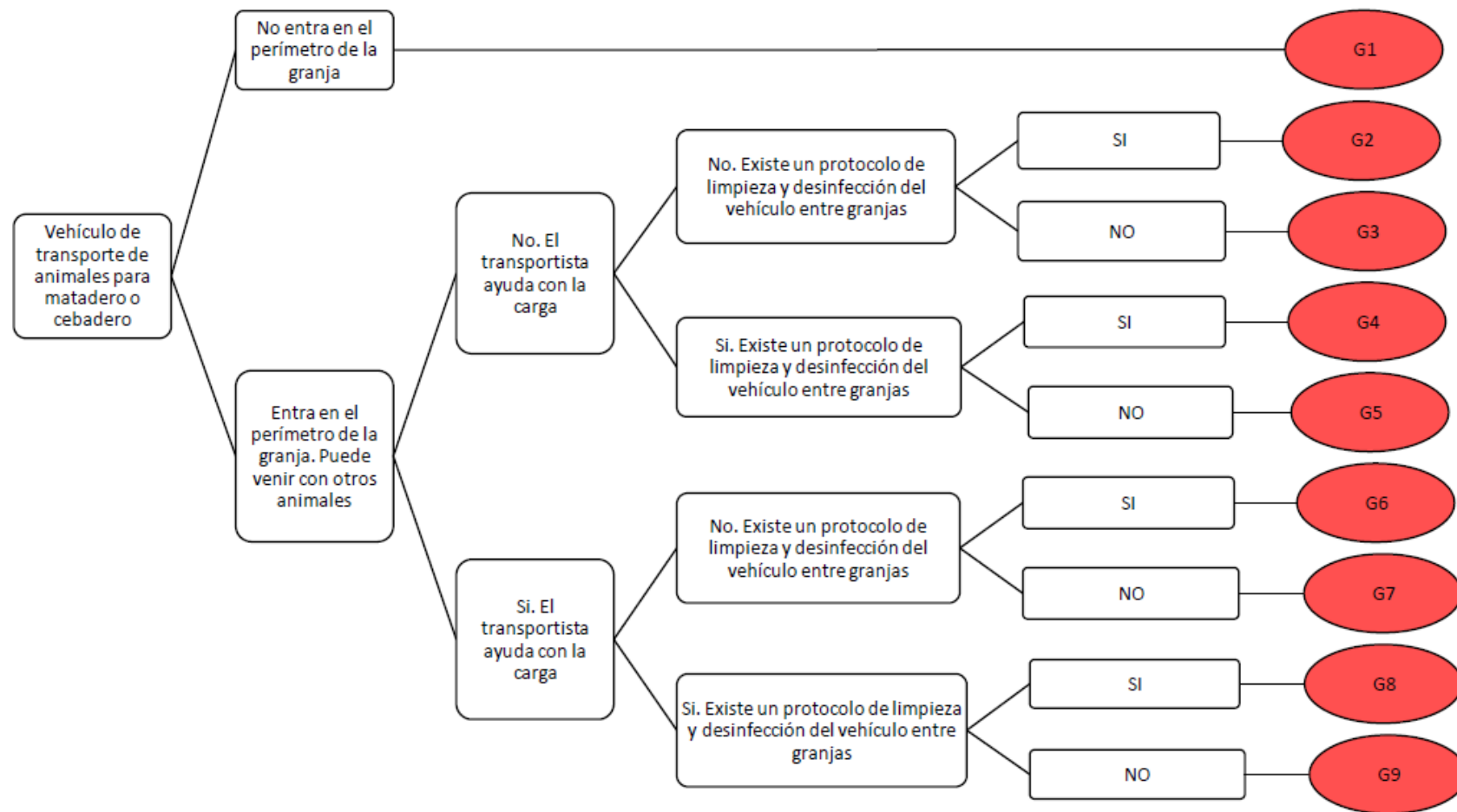


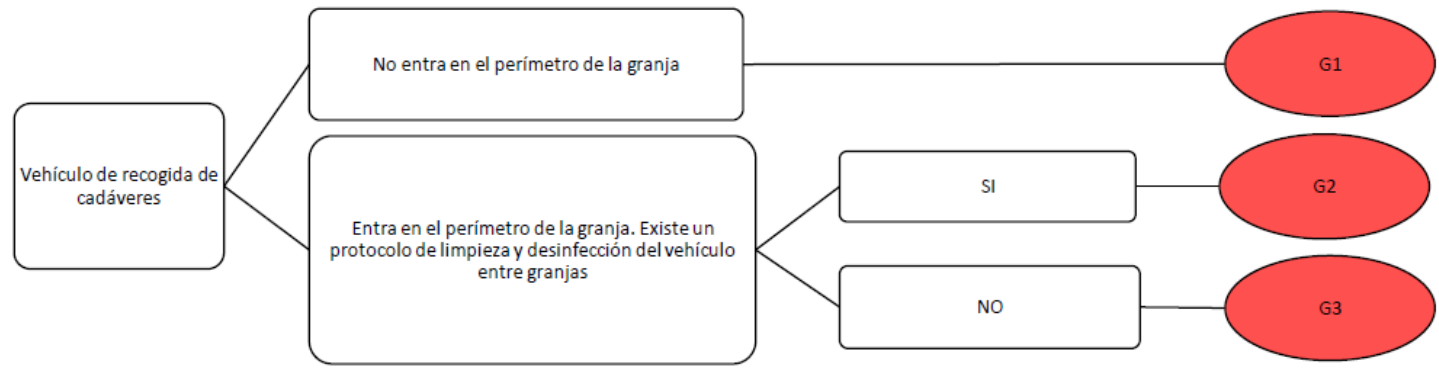


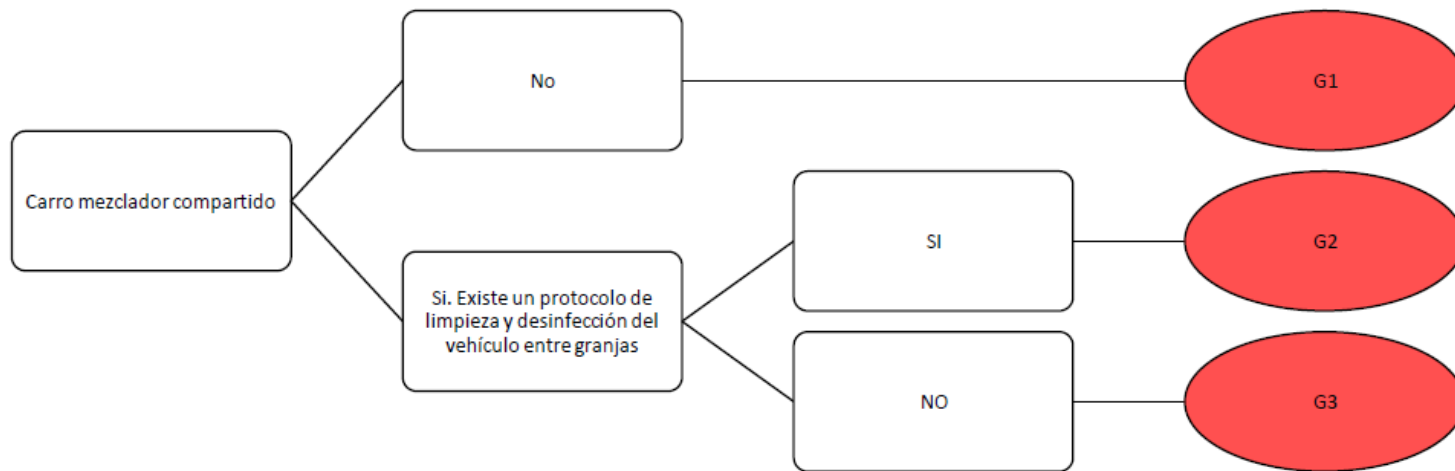


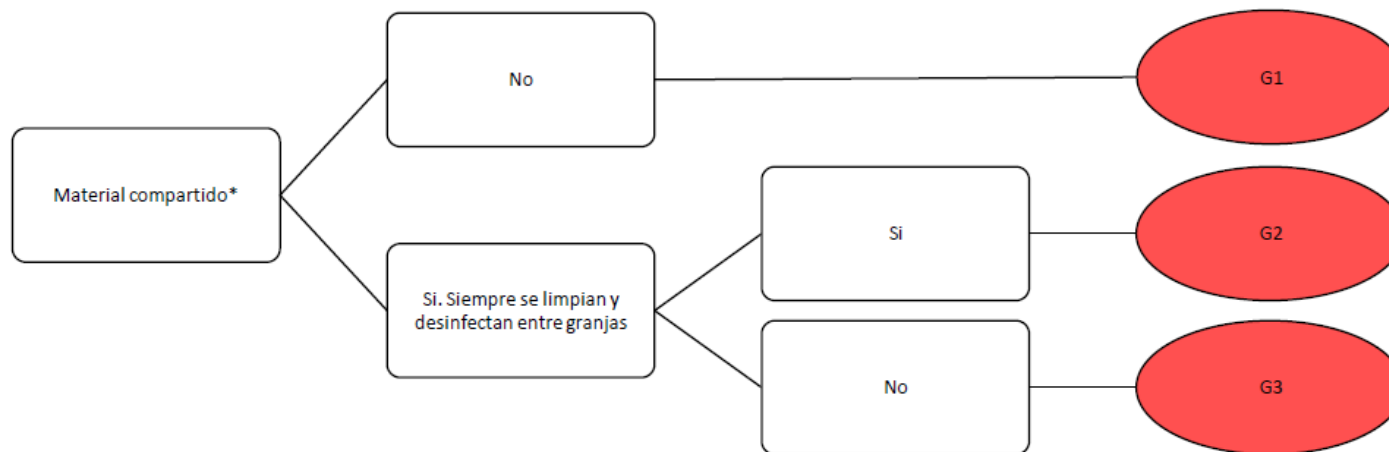




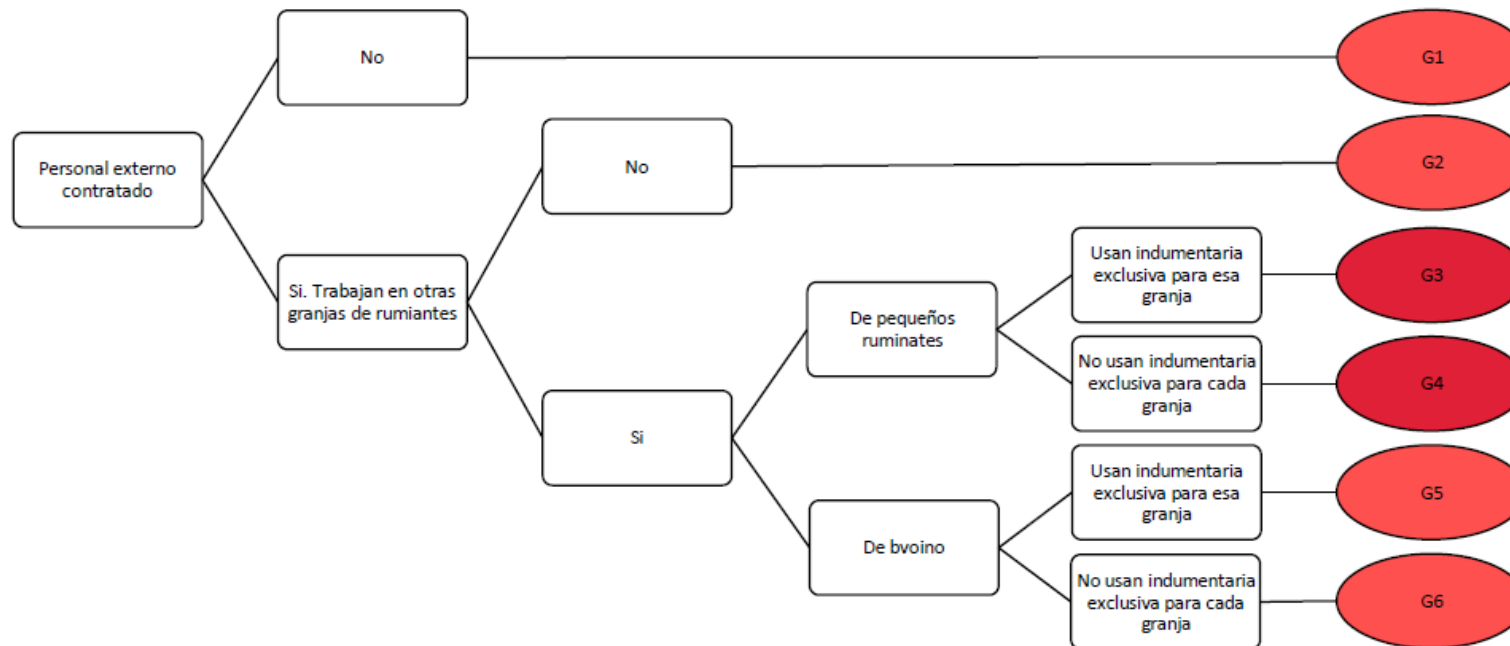


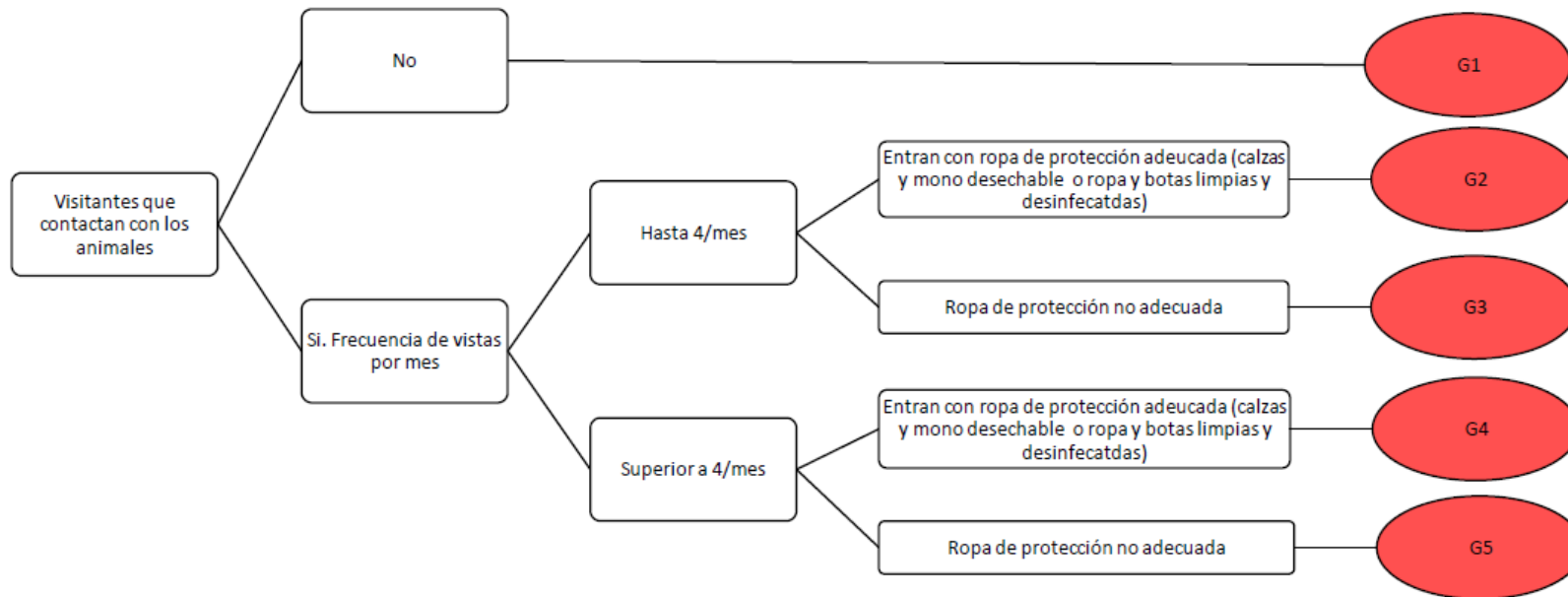






***Material de partos, material e limpieza, materiales de manejo de alimentos, materiales o máquinas relacionadas con cultivo o recogida de estos u otros materiales**





ANEXO 2

Tabla S1. Perfiles sanitarios y de bioseguridad en los tres conglomerados obtenidos a través del análisis de conglomerados de dos pasos.

		Conglomerado 1	Conglomerado 2	Conglomerado 3
BoHV-1	Infección reciente/activa	3 (4.83%)	1 (3.22%)	9 (31.0%)
	Granja libre	56 (90.3%)	1 (3.22%)	4 (13.7%)
	Animales seropositivos (pero recria seronegativa)	3 (4.83%)	29 (93.5%)	16 (55.1%)
BVDV	Infección reciente/activa	12 (19.3%)	11 (35.4%)	21 (72.4%)
	Granja libre	41 (66.1%)	7 (22.5%)	6 (20.6%)
	Animales seropositivos (pero recria seronegativa)	9 (14.5%)	13 (41.9%)	2 (6.89%)
Compra de animals (novillas/vacas)	No	39 (62.9%)	24 (77.4%)	13 (44.8%)
	SI (estado sanitario en origen)	10 (16.1%)	5 (16.1%)	3 (10.3%)
	SI (estado sanitario en destino)	13 (20.9%)	2 (6.45%)	2 (6.89%)
	Si, sin testaje	0 (0%)	0 (0%)	11 (37.9%)
Media (mediana Q1-Q3*) frecuencia de novillas/vacas compradas al año cuando sea aplicable (46 granjas)		4.1 (3;2-5)	3.0 (2; 1-3)	5.6 (3; 1-12.5)
Transporte de los animales de reemplazo	No tienen contacto con otros ruminates durante el transporte	19 (82.6%)	7 (100%)	13 (81.2%)

	Pueden tener contacto con otros rumiantes	4 (17.4%)	0 (0%)	3 (18.8%)
	No aplicable	39	24	13
Instalaciones de cuarentena adecuadas	Si	0 (0%)	1 (3.2%)	3 (10.4%)
	No	62 (100%)	30 (96.8%)	26 (89.6%)
Cría externa	No	53 (85.4%)	30 (96.7%)	27 (93.1%)
	Si	9 (14.5%)	1 (3.22%)	2 (6.89%)
Plan sanitario en la granja de cría externa	Si	6 (66.7%)	0 (0%)	0 (0%)
	No	3 (33.3%)	1 (100%)	2 (100%)
	No aplicable	53	30	27
Transplante de embriones	No	61 (98.4%)	29 (93.5%)	26 (89.7%)
	SI (estado sanitario vaca donante conocido)	1 (1.6%)	2 (6.5%)	3 (10.3%)
	SI (estado sanitario vaca donante desconocido)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Granjas de vacuno en un radio de 1 Km	No	4 (6.4%)	0 (0%)	12 (41.4%)
	Si	58 (93.6%)	31 (100%)	17 (58.6%)
Granjas de ovejas /vacas en un radio de 1 Km	No	56 (90.3%)	3 (9.7%)	21 (72.4%)
	Si	6 (9.7%)	28 (90.3%)	8 (27.6%)
Ovejas y cabras en la propia granja	No	59 (95.1%)	28 (90.3%)	26 (89.6%)
	Si	3 (4.83%)	3 (9.67%)	3 (10.3%)
Participación en concursos de ganado y ferias	No	60 (96.7%)	31 (100%)	24 (82.7%)
	SI (sin retorno)	1 (1.61%)	0 (0%)	0 (0%)
	SI (posible retorno)	1 (1.61%)	0 (0%)	5 (17.2%)
Pastoreo	No	26 (41.9%)	26 (83.8%)	18 (62.1%)

	Si, sin contacto con otros ruminates	17 (27.4%)	4 (12.9%)	7 (24.1%)
	Si, posible contacto con otros ruminates	19 (30.6%)	1 (3.3%)	4 (13.7%)
Carro de alimentación compartido	No	26 (14.9%)	3 (9.7%)	18 (62.1%)
	Si	36 (86.1%)	28 (90.3%)	11 (37.9%)
Media (mediana Q1-Q3*) numero de entradas del vehículo de alimentación a la semana		7 (7; 7-7)	7.1 (7; 7-7)	7.1 (7; 7-7)
Maquinaria compartida (tractors, remolque, cisterna, agitador de purín, empacadora y otros)	No	20 (32.2%)	21 (67.7%)	17 (58.6%)
	Si	42 (67.7%)	12 (38.7%)	10 (34.4%)
Vehículo de estiércol compartido	No	51 (82.2%)	29 (93.5%)	21 (72.4%)
	Si	11 (17.7%)	2 (6.45%)	8 (27.5%)
Media (mediana Q1-Q3*) número de entradas del vehículo del estiércol al mes (cuando se comparte)		0.31 (0.17; 0.08-0.50)	0.37(0.25; 0.17-0.45)	0.52 (0.25; 0.21-1.06)
Material compartido (crotaladora, material de partos, material de limpieza, material de cosecha y otros)	No	43 (69.3%)	26 (83.8%)	29 (100%)
	Si	19 (30.6%)	5 (16.1%)	0 (0%)
Vehículo de purín compartido	No	42 (67.7%)	21 (67.7%)	18 (62.0%)
	Si	20 (32.2%)	10 (32.2%)	11 (37.9%)
Media (mediana Q1-Q3) número de entradas del vehículo de purín al mes, cuando se comparte.		0.15 (0.08; 0.08-0.29)	0.21 (0.08; 0.08-0.34)	0.62 (0.25; 0.17-0.95)

Area de depósito de cadáveres	Fuera del perímetro de la granja	7 (11.2%)	12 (38.7%)	6 (20.6%)
	Dentro del perímetro de la granja	55 (88.7%)	19 (61.2%)	23 (79.3%)
Media (mediana Q1-Q3) número de entradas del vehículo de recogida de cadáveres en el perímetro de la granja, al mes (cuando sea aplicable).		0.12 (0.08; 0.08-0.28)	0.19 (0.17; 0.12-0.36)	0.79 (0.5; 0.33-0.93)
Vehículo recogida animales (matadero/cebo) viene con otros animales	No	1 (1.61%)	0 (0%)	3 (10.3%)
	Desconocido	4 (6.45%)	1 (3.22%)	0 (0%)
	Si	57 (91.9%)	30 (96.7%)	26 (89.6%)
Vehículo recogida animals (matadero/cebo) entra dentro del perímetro de la granja	No	2 (3.22%)	2 (6.45%)	2 (6.89%)
	Si	60 (96.7%)	29 (93.5%)	27 (93.1%)
Media (mediana Q1-Q3*) número de entradas del vehículo de recogida de animales (matadero/cebo) dentro del perímetro de la granja, al mes		2.2 (2; 1-4.8)	2.5 (2; 1.5-5.1)	2.8 (2; 1.7-5.8)
Empleados externos	No	53 (85.4%)	15 (48.3%)	0 (0%)
	Si, pero no trabajan en otras granjas	6 (9.67%)	12 (38.7%)	24 (82.7%)
	Si, y trabajan en otras granjas	3 (4.83%)	4 (12.9%)	5 (17.2%)
Vallado perimetral	Si, siempre cerrado	2 (3.22%)	0 (0%)	3 (10.3%)
	Si, no siempre cerrado	1 (1.61%)	1 (3.22%)	6 (20.6%)
	No	59 (95.1%)	30 (96.7%)	20 (68.9%)

Aparcamiento vehículos visitantes	Fuera del perímetro de la granja	1 (1.6%)	0 (0%)	3 (10.3%)
	Dentro del perímetro de la granja	61 (98.4%)	31 (100%)	26 (89.7%)
Media (mediana Q1-Q3*) número de visitantes que pueden contactar con los animals, al mes.		7.2 (3.5; 2-12)	6.2 (5; 4-7)	8.2 (8; 6.5-10)
Los visitantes usan ropa de protección	Si	0 (0%)	1 (3.22%)	8 (27.5%)
	No	62 (100%)	30 (96.7%)	21 (72.4%)

*Q1: percentil 25; Q3: percentil 75.

ANEXO 3. Publicaciones derivadas de la tesis



<https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/vetreco-2020-000399>

[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30451-3/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30451-3/fulltext)

<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/1/166>