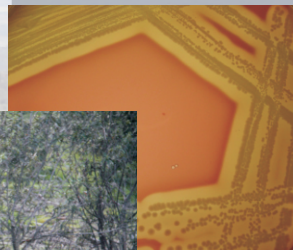
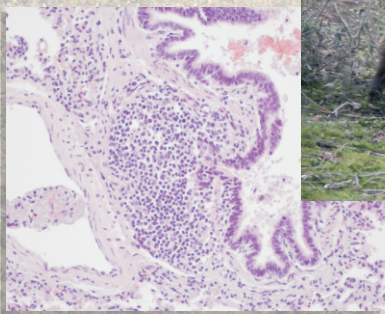


TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE PROCESOS
INFECCIOSOS EN POBLACIONES DE JABALÍ
DEL SUROESTE ESPAÑOL**



David Risco Pérez
Cátedra de Patología Infecciosa
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE PROCESOS INFECCIOSOS EN POBLACIONES DE
JABALÍ DEL SUROESTE ESPAÑOL

DAVID RISCO PÉREZ

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Conformidad de los directores:



Fdo: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo



Fdo: Luis Jesús Gómez Gordo



Fdo: Pedro Fernández Llario

2014



**Unidad de Patología Infecciosa
Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria de Cáceres
Universidad de Extremadura**

D. Javier Hermoso de Mendoza Salcedo, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, **D. Luis Jesús Gómez Gordo**, Profesor Titular del Departamento de Medicina Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y **D. Pedro Fernández Llario**, Investigador Doctor asociado al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Caracterización de procesos infecciosos en poblaciones de jabalí del suroeste español”** ha sido realizada por el licenciado en Veterinaria **D. David Risco Pérez** en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura bajo nuestra dirección y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor Internacional por la Universidad de Extremadura.

Parte de esta tesis, ha sido realizada en el Animal Health Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), Addelstone, Weybridge, Reino Unido y en el Servicio de Ecopatología de Fauna Salvaje (SEFaS), Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), España.

Fdo: Dr. Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

Fdo: Dr. Luis Jesús Gómez Gordo

Fdo: Dr. Pedro Fernández Llario



University College Dublin

School of Veterinary Medicine

Veterinary Sciences Centre, UCD, Belfield, Dublin 4, Ireland
Tel: (353)-1- 716 6073 Fax: (353)-1- 716 6091 e-mail: egormley@ucd.ie

20 May 2014

To whom it may concern:

Re: PhD studies of David Risco

In the central, south and west regions of Spain, wild boar are an important economic resource as part of the profitable game business. Wild boar populations also have important ecological functions, taking advantage of wide areas of forested or bushed mountain and dehesas, where, among other useful activities, they efficiently scavenge in areas inaccessible to vultures. Because of the growing economic interest, the number of game estates and farms attempting to breed these animals is growing each year.

As a relatively new form of farming, it is under constant threat, and success or failure can frequently be linked to sanitary conditions. Disease outbreaks are not uncommon, often involving pathogens associated with domestic pig farms. However, frequently the diseases of wild boar possess their own particular clinical or epidemiological features. In addition, as the study of diseases in wild boar increases, it is becoming more apparent that wild boar populations have become an important reservoir of zoonotic pathogens that may affect both domestic animals and humans. Among these, tuberculosis and swine brucellosis would be prominent examples.

To date, relatively little has been known about the pathogenesis and epidemiology of wild boar diseases. In his PhD studies, David Risco Pérez has begun the ambitious task of defining important wild boar pathogens in order to generate fundamental information that would be required to establish control measures that could limit the impact of disease in wild boar populations. These studies have revealed fundamental and important information on a variety of pathogens never or rarely described in this sub-species. The finding of an association between porcine circovirus type 2 infections and prevalence of tuberculosis in wild boar is particularly interesting and intriguing, and is something I must consider in my own line of wildlife tuberculosis research. This is a very important contribution to understanding pathogenesis of tuberculosis in livestock and wildlife, and will lead to the opening up of new avenues of research.

The description of other diseases, including pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila*, brucellosis caused by *Brucella suis*, ocular infection by *Chlamydia suis*, swine erysipelas, pasteurellosis and staphylococcal infection serves to highlight the disease risks associated with wild boar farming.

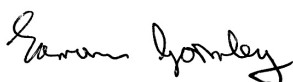
The publications arising from this work include:

- 1.- *High-Density Dependence But Low Impact on Selected Reproduction Parameters of Brucella suis Biovar 2 in Wild Boar Hunting Estates from South-Western Spain*. D. Risco, A. García, E. Serrano, P. Fernandez-Llario, J. M. Benítez, R. Martínez, W. L. García and J. Hermoso de Mendoza (2013) *Transboundary and Emerging Diseases*. *In Press*.
- 2.- *Influence of Porcine Circovirus Type 2 Infections on Bovine Tuberculosis in Wild Boar Populations*. D. Risco, P. Fernandez-Llario, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, J.M. Cuesta, R. Martínez, C. Sanz, M. Sequeda, L. Gómez, J. Carranza and J. Hermoso de Mendoza (2013) *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 121-127.

- 3.- *Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain.* D. Risco, P. Fernández Llarío, R. Velarde, W.L. García, J.M. Benítez, A. García, F. Bermejo, M. Cortés, J. Rey, J. Hermoso de Mendoza, L. Gómez (2011) *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 445-450.
- 4.- *Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain.* D. Risco, P. Fernández-Llarío, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, M. Gil, P. Gonçalves, R. Martínez, L. Gómez, A. García, J. Rey, M. Hermoso de Mendoza, J. Hermoso de Mendoza (2013) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 791-794.
- 5.- *A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate.* D. Risco, P. Fernández-Llarío, R. Velarde, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, M. Gil, A. García, J. Rey, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza (2013) *Journal of Swine Health and Production*, 21, 304-308.
- 6.- *Ocular lesions associated with *Chlamydia suis* in a wild boar piglet (*Sus scrofa*) from a semi-free range population in Spain.* D. Risco, A. García, P. Fernández-Llarío, W.L. García, J.M. Benítez, P. Gonçalves, J.M. Cuesta, L. Gómez, J. Rey, J. Hermoso (2013) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44, 159-162.
- 7.- *Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the respiratory tract of wild boar: Pathological implications.* D. Risco, P. Fernández-Llarío, J. M. Cuesta, J. M. Benítez-Medina, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, P. Gonçalves, J. Hermoso de Mendoza, L. Gómez and A. García (2013) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44, 1090-1093.
- 8.- *Pathological consequences of infections with main porcine respiratory pathogens in wild boar from southwestern Spain.* D. Risco, J. M. Cuesta, P. Fernández-Llarío, J. Salguero, P. Gonçalves, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, R. Velarde, M. Hermoso de Mendoza, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza. *Veterinary Pathology*. *Under review*.
- 9.- *Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar.* D. Risco, E. Serrano, P. Fernández-Llarío, J. M. Cuesta, P. Gonçalves, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, R. Cerrato, R. Velarde, L. Gómez, J. Segalés, J. Hermoso de Mendoza. *PLoS One*. *Under Review*.
- 10 - *Fatal case of *Streptococcus suis* infection associated to high mortality in a wild boar population from South-Western Spain.* D. Risco, P. Fernández-Llarío, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, M. Gil, R. Martínez, A. García, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza. *Journal of Wildlife Diseases*. *Under Review*.

The excellent studies conducted by David Risco for his PhD contribute significantly to our scientific knowledge on the diseases of wild boar and the role this host plays in the epidemiology of disease. It is unusual for one PhD study to cover such a diverse range of pathogens, but this highlights the growing awareness of the importance of pathogen communities, rather than the study of a single disease, notwithstanding. The study results will be of great interest to others studying wildlife, and also to existing and prospective farmers who wish to manage wild boar groups. It is likely that the key information will eventually contribute and possibly influence decisions on the eradication of bTB from wildlife and cattle. Therefore, I have no hesitation in recommending David Risco Pérez for an International Mention for his Doctorate.

Yours sincerely,



Eamonn Gormley PhD
Director of Badger Vaccine Research

21 May 2014

David Risco Pérez

PhD Thesis



Faculty of Health and Medical Sciences

University of Surrey

Guildford, Surrey GU2 7XH

UK

To whom it may concern,

Wildlife is suggested to be the main reservoir of zoonotic infectious diseases worldwide. In Spain the population of wild boar has experienced a considerable increase over the last 10 years, mainly due to the implementation of intensive management measures that have promoted very profitable activities such as hunting. In his PhD thesis, David Risco Pérez has carried out an intensive epidemiological study on the most predominant porcine pathogens in Spanish wild boar. Some of the identified pathogens have been: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella suis*, *Chlamydia suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, PCV2, PRRSV, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis* and swine influenza. The second goal of David's thesis has been to assess if infections by these pathogens can have an impact on the prevalence and transmission of tuberculosis from wild boar to cattle. All these studies have been published as peer reviewed scientific papers in international journals with excellent reputation in the field of Veterinary Science:

1. Risco et al., 2013. High-Density Dependence But Low Impact on Selected Reproduction Parameters of *Brucella suis* Biovar 2 in Wild Boar Hunting Estates from South-Western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. In Press.
2. Risco et al., 2013. Influence of Porcine Circovirus Type 2 Infections on Bovine Tuberculosis in Wild Boar Populations. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 121-127.
3. Risco et al., 2011. Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 445-450.
4. Risco et al., 2013. Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 791-794.
5. Risco et al., 2013. A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate. *Journal of Swine Health and Production* 21, 304-308.
6. Risco et al., 2013. Ocular lesions associated with *Chlamydia suis* in a wild boar piglet (*Sus scrofa*) from a semi-free range population in Spain. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44, 159-162.
7. Risco et al., 2013. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the respiratory tract of wild boar: Pathological implications. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44, 1090-1093.

In addition, the following manuscripts are currently under revision:

1. Risco et al. Pathological consequences of infections with main porcine respiratory pathogens in wild boar from southwestern Spain. *Veterinary Pathology*.
2. Risco et al. Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar. *PLoS One*.
3. Risco et al. Fatal case of *Streptococcus suis* infection associated to high mortality in a wild boar population from South-Western Spain. *Journal of Wildlife Diseases*.

Clearly, the PhD thesis of David Risco Pérez has not only contributed to our scientific knowledge on the infectious diseases in wild boar but also provides very valuable information for the implementation of control measures aimed at reducing tuberculosis in wildlife and domestic animals. Therefore, I highly recommend David Risco Pérez for an International Mention for his doctorate.

Yours sincerely,

Jorge Gutiérrez Merino

Lecturer in Food Security, Department of Nutritional Sciences, School of Biosciences and Medicine
Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a:

Beca para la Formación de Profesorado Universitario FPU (AP 2009-0704) convocadas por el Ministerio de Educación y Ciencia (Orden EDU/3083/2009, de 6 de noviembre de 2009) y resueltas en Orden EDU/2622/2010, de 1 de octubre de 2010).

Ayuda para estancias breves en Centros de Investigación (Acción IV). Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Extremadura 2011.

Y ha sido consecuencia de la participación en los siguientes proyectos:

Valoración del uso de técnicas de sincronización del celo y programas sanitarios en la mejora de la eficiencia reproductiva del cerdo ibérico.

Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura.

(PRI08A62).

Procedimientos de mejora sanitaria de una explotación caprina. Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura (PDT09A046).

Tipificación molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex aisladas en pacientes humanos y animales. Instituto de Salud Carlos III,

Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. (PS09/00513).

Además, se ha realizado en el marco de los convenios de colaboración con:

**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Medio Ambiente y Energía de la
Junta de Extremadura**

*No sé si estoy en lo cierto,
Lo cierto es que estoy aquí...*

*Rosendo Mercado
"Maneras de Vivir"*

AGRADECIMIENTOS

Debido a mi manera de hacer las cosas, no podía imaginarme escribiendo estas líneas de otra forma que no fuera la noche antes de mandar a imprimir la tesis o incluso, el mismo día de su entrega. Sin embargo, sorprendentemente, aquí me hallo, escribiendo esta sección a un mes vista de entregar el trabajo definitivo. Posiblemente, llevo tiempo pensando en la elaboración de este apartado y me he dado cuenta de lo importante que es dar las gracias a todas las personas que han aportado su granito de arena en el desarrollo de esta tesis.

Como no podría ser de otra forma, en primer lugar quería personalizar estos agradecimientos hacía mis directores de tesis: Javier, Pedro y Luis.

Quería dar las gracias a Javier Hermoso de Mendoza por su dedicación a la hora de plantear y revisar los diferentes trabajos científicos realizados durante estos años, por maquillar magníficamente las carencias de ese *“inglés de Siruela”* característico y sobre todo, por no poner obstáculo alguno a la hora de desarrollar cualquier tipo de idea. Desde mi punto de vista esta última es una de las mejores virtudes que puede tener el director de un grupo de investigación.

Agradecer a Pedro Fernández Llario su dirección durante todos estos años. Los que trabajamos en este campo sabemos que sin él, nada de esto hubiera sido posible. Gracias por poner todas las facilidades del mundo a la hora de tomar muestras y recoger datos, por tener siempre una respuesta creativa para todas las preguntas que se puedan plantear y por su implicación máxima en la realización de todos los trabajos incluidos en esta tesis.

Por último, agradecer a Luis Gómez Gordo todo lo hecho por mí en estos más de 7 años que hace que nos conocemos. Conseguir esto es mucho más fácil cuando en el ecuador de la licenciatura, ese momento en el que un alumno apenas se ha parado a pensar en el futuro, alguien te da su total confianza y te empieza a introducir en este mundo de la investigación. Gracias por abrirme las puertas necesarias para iniciar esta etapa y por todo lo demás, que es casi infinito.

Llegados a este punto creo que es de rigor acordarme y dar las gracias a mis compañeros de faena, a los que me han apoyado y ayudado tanto en los trabajos de campo como en el laboratorio.

Gracias a Waldo, Chema, María Cortés, Félix y Belinda por acogerme en el departamento como si fuera uno más desde el principio, por enseñarme todas esas cosas que uno desconoce cuándo comienza una andadura de este tipo, por acompañarme durante todo este periodo y por la ayuda prestada durante la realización de esta tesis.

Imposible agradecer a Pilar toda su ayuda; gracias por estar siempre dispuesta a colaborar y por las infinitas horas gastadas en la sala de necropsias organizando y procesando muestras. Gracias a Remi por su incesante ayuda en múltiples aspectos de esta tesis. Es magnífico tener a alguien que siempre que le preguntas algo te contesta y si no sabe la respuesta, la busca para contestarte. Gracias a Alfredo García, el “CR7” del laboratorio. Trabajando con él todas las técnicas de laboratorio resultan sencillas y un gran porcentaje de lo que sé de ese tema actualmente, es por su culpa. Por último, dar las gracias a Inés, María Gil y Elisa. Muchas gracias por vuestra ayuda tanto en la toma de muestras como en el laboratorio y por todos los buenos ratos pasados durante este periodo.

Cómo no, quería dar las gracias también a los profesores y personal técnico del departamento de Patología Infecciosa. Gracias a Miguel, Joaquín y Juanma por su ayuda durante todos estos años y por estar siempre dispuestos a resolver cualquier duda que pudiera surgir. Muchas gracias también a Raquel Rubio y a Montaña, la cual ha sido mi compañera de mesa durante esta experiencia y me ha enseñado todo lo que se hace en la “cocina”, laboratorialmente hablando.

Por supuesto, agradecer a Rosario y Maribel toda la ayuda prestada durante los interminables papeleos y por hacer que todos los temas burocráticos resulten mucho más fáciles. También agradecerles toda la información proporcionada referente a becas, ayudas o contratos que pudieran ser interesantes. Gracias por estar siempre

alerta y espero que tengamos que arreglar muchos más papeles porque eso será muy buena señal.

También quería agradecer toda la ayuda prestada por los compañeros del Departamento de Anatomía Patológica. Gracias a Chuchi por su colaboración en los muestreos, por los ratos gastados en el microscopio y por supuesto, por estar siempre disponible para retocar una foto o hacer una composición de imágenes con el Photoshop... no sé qué habría hecho sin él!! También agradecer a Javi Galapero, Paula, Sara, Diana, y Flor su ayuda con las inmunos, ya que sin su colaboración los protocolos no hubieran salido para adelante. Tampoco me quiero olvidar de Pilar Parra, que aunque ya no esté en el departamento, trabajó dura y eficientemente en el procesado de muchas de las muestras que se incluyen en esta tesis. Gracias por todo!!

Además, me gustaría acordarme en esta sección de todas las personas con las que me he encontrado durante mis estancias en otros centros. Muchas gracias a la gente del SEFaS: Santiago, Emmanuel, Roser, Ignasi, Nora, Gregorio, Jorge, Rafi, Javi, Xavi, Laura, Encarna, Oscar... Gracias a todos por hacer tan fácil mi estancia con vosotros y por toda vuestra ayuda. Muy especialmente quería dar las gracias a Roser y Emmanuel ya que sin su ayuda gran parte de los trabajos de esta tesis no hubieran existido. Espero que sigamos colaborando y trabajando juntos muchos años!!!

Como es normal, también me apetece recordar en estas líneas a toda la gente con la que me encontré en Reino Unido, especialmente a Javier Salguero y Rubén Rosales. Gracias por toda vuestra ayuda, pero sobre todo por hacerme sentir como en casa pese a estar a miles de kilómetros!! Espero de todo corazón que podamos seguir haciendo cosas juntos en el futuro. También quería dar las gracias a Obdulio, mi compañero en casa de "Janice", por hacer que mi estancia allí fuera mucho más llevadera y por enseñarme infinidad de cosas en el laboratorio. Espero que sigamos en contacto y que todo te vaya estupendamente. Recordar además a la gente del grupo de españoles del AHVLA (Juan Seva, Ángel, Ana, Javi...), del grupo internacional (Richard, John, Stephan...) y de toda la gente de los Departamento de Patología y del

grupo de *Mycoplasma* (Ann, Robin, Roger, Faye, Graham, Miro, Hilary...). Gracias por facilitarme tanto las cosas y por acogerme como si fuera uno más.

Por supuesto, quería dar las gracias a la gente con la que hemos colaborado durante el desarrollo de esta tesis. Gracias a la gente del CRP de Córdoba, a Quim Segalés por su implicación en cualquier tema que se le propone y a Jaime Gómez Laguna y Francisco José Pallares, por su inestimable ayuda durante la puesta a punto de los ensayos inmunohistoquímicos.

También quería acordarme de mis compañeros de promoción: Eu, Javi, Nacho, Alex, Chus, Bea, Gloria, Elena, Noelia Pérez, Víctor, Raul.... de todos!!! Gracias por toda la ayuda prestada durante la carrera y sobre todo, por esos buenos ratos pasados en el ferial, en la Bodeguilla o en algún bar de la Madrila, que fueron casi tan importantes como los ratos de estudio para conseguir sacar la carrera adelante, que al fin y al cabo, es el primer paso para conseguir esto. Gracias!!

Aterrizando en un ámbito menos profesional, también me gustaría dar las gracias a mi familia y amigos, los cuales han jugado un papel fundamental en el desarrollo de esta tesis y lo juegan en mi vida en general.

Gracias a mis padres por apoyarme siempre y por darme una educación ejemplar que siempre me ha mostrado el camino correcto. Sois piezas clave en este asunto y sin vosotros nada de esto hubiera existido. Gracias, a mis hermanos por interesarse siempre por mis cosas y por darme su apoyo incondicional durante todo este tiempo. También, es indispensable acordarme en estas líneas de mis abuelos. Aunque algunos de ellos ya no estén con nosotros han sido fundamentales en mi educación y en los pasos seguidos para llegar hasta aquí. Gracias en general a toda mi familia (primos, titos y sobrinos) porque los momentos que vivo con vosotros son los que me han dado las fuerzas necesarias para conseguir esto.

Por supuesto, no tengo palabras para dar las gracias a Laura. Gracias por acompañarme durante todos estos años, gracias por aguantarme en los momentos malos, por ayudarme a salir de ellos y por proporcionarme la felicidad que necesito para afrontar con energía cualquier reto que se presente en mi vida. Gracias!!!

Por último agradecer enormemente a todos mis amigos del pueblo, la cuadrilla de la caza, los compañeros del deporte... en definitiva, a toda la gente que me conoce y me quiere, porque siento que todos habéis contribuido con vuestro granito de arena al desarrollo de este trabajo.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

En Cáceres a 17 de abril de 2014

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción y revisión bibliográfica	1
1.1 El jabalí	1
1.1.1 <i>Definición y características</i>	1
1.1.2 <i>Distribución y hábitat</i>	3
1.1.3 <i>Alimentación</i>	4
1.1.4 <i>Reproducción</i>	5
1.1.5 <i>Comportamiento del Jabalí</i>	8
1.1.6 <i>Adaptación del jabalí a nuevos hábitats y sistemas de cría</i>	10
1.2 Importancia del jabalí en la actualidad.....	13
1.2.1 <i>Importancia económica</i>	13
1.2.2 <i>Importancia social</i>	15
1.2.3 <i>Importancia sanitaria</i>	17
1.3 Estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí	24
2. Objetivos y estructura de la tesis	31
3. Bloque I: Estudio de las repercusiones clínicas provocadas por determinados patógenos infecciosos en las poblaciones de jabalí. Situación epidemiológica y medidas de control	39

3.1 Elevada dependencia de la densidad poblacional pero bajo impacto en los índices reproductivos de <i>Brucella suis</i> Biovar 2 en fincas de jabalíes del suroeste español (<i>High-Density dependence but low impact on selected reproduction parameters of Brucella suis Biovar 2 in wild boar hunting estates from south-western Spain</i>).....	41
3.2 Observaciones lesionales del Complejo Respiratorio Porcino en el jabalí. (<i>Pathological observations of Porcine Respiratory Disease Complex in the wild boar</i>).	59
4. Bloque II: Efecto de las infecciones concomitantes por diferentes patógenos en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Consecuencias sanitarias e implicación en medidas de control.....	101
4.1 Influencia del circovirus porcino tipo 2 en la tuberculosis bovina en poblaciones de jabalíes. (<i>Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations</i>).	104
4.2 La comunidad de patógenos influye en la gravedad de la tuberculosis en el jabalí. (<i>Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar</i>).	119
5. Bloque III: Estudio descriptivo de diferentes brotes de enfermedades infecciosas en poblaciones de jabalí. Marco epidemiológico y aplicación de medidas de control	165

5.1	Brote de mal rojo en una finca semi-intensiva de jabalí en España. (<i>Outbreak of Swine Erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain</i>).....	167
5.2	Brote mortal de pasterelosis septicémica en una población de jabalíes del suroeste de España. (<i>Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in wild boar (Sus scrofa) population from southwest Spain</i>).....	179
5.3	Caso mortal de infección por <i>Streptococcus suis</i> asociado con elevadas mortalidades en una población de jabalíes del suroeste de España. (<i>Fatal case of Streptococcus suis infection associated to high mortality in a wild boar population from south-western Spain</i>).....	187
5.4	Caso de epidermitis exudativa en un jabalí joven perteneciente a una finca de caza en España. (<i>A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate</i>).....	201
5.5	Lesiones oculares asociadas a <i>Chlamydia suis</i> en una cría de jabalí en una población semi-intensiva de España. (<i>Ocular lesions associated with Chlamydia suis in a wild boar piglet (Sus scrofa) from a semi free range population in Spain</i>).....	213
5.6	Aislamiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> del tracto respiratorio del jabalí: implicaciones patológicas. (<i>Isolation of Aeromonas hydrophila in the respiratory tract of wild boar: pathologic implications</i>).....	221
6.	Discusión General	233
7.	Conclusiones	245

8. Conclusions	249
9. Resumen	253
10. Summary	259
11. Anexo I: Índice de imágenes.....	265
12. Anexo II: Índice de tablas	271
13. Anexo III: Índice de abreviaturas	275
14. Referencias bibliográficas	279

Introducción y revisión bibliográfica

1. Introducción y revisión bibliográfica

1.1 El jabalí

1.1.1 Definición y características

El jabalí (*Sus scrofa*) es un mamífero salvaje que está considerado como el antecesor del cerdo doméstico (Lipowski, 2003). El jabalí se encuadra dentro de la familia taxonómica *Suidae* y junto a otras 7 especies (*Sus salvanius*, *Sus verrucosus*, *Sus barbatus*, *Sus cebifrons*, *Sus celebensis*, *Sus philippensis* y *Sus bucculentus*) integran el género *Sus*. Dentro de la especie *Sus scrofa*, podemos encontrar hasta 17 subespecies distintas de las cuales, 2 han sido descritas en España: *Sus scrofa castilianus* y *Sus scrofa baeticus* (Cabrera, 1914).

El jabalí es un mamífero de mediano tamaño con un dimorfismo sexual no muy marcado. Los machos son entre un 5 y un 10 % más grandes que las hembras y tienen el cráneo más alargado. Su cuerpo es compacto, sin apenas presencia de cuello, su cabeza es alargada, con orejas erguidas y sus extremidades relativamente cortas, con un mayor desarrollo del tren anterior. La característica que más diferencia a los machos de las hembras es el distinto desarrollo que manifiestan sus caninos. Mientras que en los machos estas piezas dentarias se desarrollan notablemente con un ritmo de crecimiento de aproximadamente 3 mm por año llegando a convertirse en verdaderas armas de defensa y ataque, en las hembras tienen un desarrollo mucho menor (Fernández-Llario y cols., 2003). Por otra parte, los machos presentan una piel más gruesa y con una mayor dureza en la zona de la espalda, formando de este modo una coraza que les permite evitar heridas de gravedad cuando combaten contra otros machos en las épocas de celo (Rosell y cols., 2001).

En la península ibérica el peso de los machos adultos varía entre los 75 y 85 kg mientras que el de las hembras oscila entre 55 y 65 Kg de peso (Fernández-Llario, 2006). El peso y el tamaño de estos animales varían notablemente dependiendo de la localización geográfica. Así, en zonas del este y norte de Europa

se han descrito jabalíes con un tamaño sensiblemente superior, llegando a alcanzar los 300 Kg de peso (Rosell y cols., 2001). Dentro de la península ibérica, también podemos observar variaciones en el tamaño de los jabalíes dependiendo de la zona geográfica, encontrando animales con una menor talla y peso en latitudes más septentrionales (Fernández-Llario, 2006).

La coloración del jabalí varía ostensiblemente con la edad. Así, desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad, presentan una típica coloración a rayas que tiene la misión de mimetizar el cuerpo del pequeño jabalí entre los pastos y que ha servido para darles el nombre de “rayones” (Imagen 1). Entre los seis meses y el año de vida, los jabalíes adquieren una coloración entre rojiza y parduzca, razón por la que se les denomina “bermejós”. A partir del año de vida, el color del pelo se oscurece y comienza a adquirir tonalidades canosas por algunas partes del cuerpo, fundamentalmente ciertas zonas de la cabeza y los flancos. Los machos de mayor edad pueden llegar a presentar un aspecto canoso generalizado (Fernández-Llario, 2006).



Imagen 1: Jabalíes adultos y crías de jabalí con su típica coloración a rayas que les proporciona el nombre de “rayones”.

La dentadura del jabalí adulto está compuesta por un total de 44 piezas (6 incisivos, 2 caninos, 6 premolares y 8 molares en cada una de las arcadas dentarias). La evolución dentaria es de gran utilidad en estos animales a la hora de determinar su edad. Así, atendiendo al patrón de erupción dentaria podemos

estimar la edad de estos animales hasta los 30 meses, momento en el que todas las piezas dentales definitivas se han desarrollado (Sáez-Royuela, 1989). En los animales mayores de 30 meses la estimación de la edad se podría realizar atendiendo a criterios como el grado de erosión sufrido por premolares y molares (Fernández-Llario, 2006), así como por métodos basados en la estimación de la relación existente entre el cemento y el canal dentario de los incisivos de estos animales, método que está siendo actualmente validado por nuestro grupo de investigación (Gonçalves y cols. *En preparación*).

1.1.2 Distribución y hábitat

La distribución del jabalí es amplia, pudiendo encontrar ejemplares de esta especie en Europa, Asia, norte de África, América, Australia, Nueva Zelanda y gran cantidad de islas del planeta (Rosell y cols., 2001). En un principio, la distribución de este animal se limitaba a ciertas zonas de Europa, Asia y norte de África; sin embargo, el jabalí ha ido colonizando otras áreas geográficas, muchas veces a causa de introducciones voluntarias llevadas a cabo por los humanos (Rosell y cols., 2001; Fernández-Llario, 2006). En la actualidad, debido a la falta de aprovechamiento del terreno que existe en bastantes áreas rurales, sobre todo en los países desarrollados, el jabalí continúa en expansión aumentando año tras año su presencia en un gran número de países (Rosell y cols., 2001) (Imagen 2).

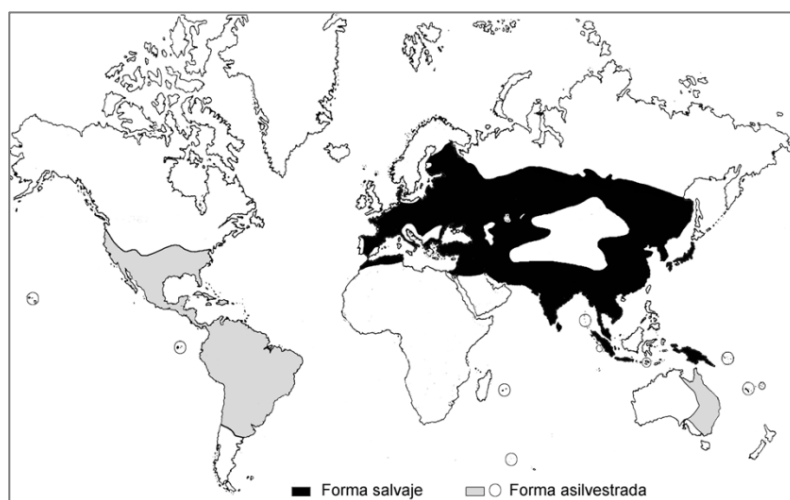


Imagen 2: Distribución geográfica de las formas salvajes y asilvestradas de *Sus scrofa* (Sjarmidi y cols., 1988). La figura no incluye las áreas de reciente colonización.

En la península ibérica podemos encontrar poblaciones de jabalíes desde los bosques de los Pirineos hasta las dunas de la desembocadura del Guadalquivir, pasando por las zonas de bosque mediterráneo del cuadrante sudoccidental, Sierra Nevada, los bosques de repoblación de pinos de la costa mediterránea, los ecosistemas húmedos de la cornisa cantábrica y gallega o los bosques-islas que sobreviven entre las urbanizaciones que pueblan los alrededores de nuestras grandes ciudades, tal y como ocurre en Madrid y Barcelona (Abaigar, 1990; Fernández-Llario, 1996; Rosell, 1998; Herrero, 2002).

El jabalí puede ocupar muy diferentes hábitats en los cuales consigue explotar de una forma realmente eficiente los recursos naturales que estos ofrecen. De este modo, en España podemos hallar poblaciones de estos animales en bosques con gran cantidad de árboles y matorrales, en marismas y terrenos húmedos situados junto al mar, así como en áreas en las que intentan aprovechar recursos generados por el hombre (Fernández-Llario, 2006).

1.1.3 Alimentación

Debido a su carácter oportunista, el jabalí presenta una dieta en la que tienen cabida un gran número de alimentos y que dependerá de los recursos que la naturaleza ofrezca en cada momento. De forma general, se puede indicar que el jabalí es una especie omnívora con un amplio espectro trófico y con unas costumbres marcadamente estacionales que le permiten aprovechar los recursos que ofrecen cada estación y ecosistema (Fernández-Llario, 2006).

Su dieta está compuesta generalmente por elementos de origen vegetal aunque también hay una parte significativa de origen animal (invertebrados fundamentalmente). Es de destacar que aunque los jabalíes consumen una gran cantidad de alimentos de origen vegetal, al tratarse de una especie con un estómago monogástrico, apenas pueden asimilar el 30 % de la proteína de este origen (Abaigar, 1990; Herrero y cols., 2006). Aunque algunos autores consideran que la ingesta de proteína animal es meramente oportunista, la escasez de este componente en el alimento vegetal unida a su deficiente asimilación, determinan

que realmente sea una necesidad imperiosa (Abaigar, 1990; Rosell, 1998; Herrero, 2002). Esta demanda se hace más notable en los animales jóvenes (menores de 1 año), los cuales requieren un mayor aporte proteico (Groot-Bruinderink y cols., 1994). En muchas ocasiones, esta necesidad les hace explorar otras fuentes de alimentación que les proporcionan gran cantidad de proteínas como pueden ser cadáveres de otras especies o incluso de sus propios congéneres (Gortázar y cols., 2006).

Para su alimentación, el jabalí aprovecha tanto los pastos disponibles en cada momento, como los recursos que puede encontrar en las capas más superficiales del suelo. Es habitual que en las épocas húmedas del año, el jabalí remueva el suelo con su hocico en busca de alimento, dejando unas típicas marcas a las que denominamos hozaduras (Fernández-Llario, 1996). En algunas zonas en las que el terreno lo permite, esta práctica se lleva a cabo durante todo el año, con máximos en septiembre y mínimos en julio (Puigdefábregas-Tomás, 1981). Existen preferencias muy marcadas por hozar en las proximidades de leguminosas, posiblemente buscando una mayor cantidad de invertebrados y plantas con un mayor contenido de proteína (Fernández-Llario, 1996).

En España, los alimentos que el jabalí incluye en su dieta varían notablemente dependiendo de la zona geográfica y de la estación del año en la que nos encontremos (Abaigar, 1990; Valet y cols., 1994; Herrero y cols., 1995; Sáenz de Buruaga, 1995). Así, dependiendo de estas circunstancias, la fracción vegetal ingerida por el jabalí estaría compuesta principalmente por frutos como la bellota, cereales, raíces o plantas acuáticas. Por su parte, dentro de la fracción animal que forma parte de la dieta del jabalí podemos encontrar restos de invertebrados, anfibios, micromamíferos o incluso restos (carroñas) de otros mamíferos que cohabitan con el jabalí como el ciervo y el gamo (Fernández-Llario, 1996; Rosell y cols., 2001).

1.1.4 Reproducción

El jabalí es una especie bastante prolífica desde el punto de vista

reproductivo principalmente por tres motivos: la temprana edad a la que alcanzan la madurez sexual, el corto periodo de gestación necesario para el desarrollo de las crías (120-130 días) y el elevado número de descendientes que obtienen en cada camada, que puede oscilar entre 3.3 y 4.2 de media en las poblaciones españolas (Rosell y cols., 2001).

La actividad reproductiva del jabalí está notablemente influida por la cantidad de recursos que ofrece la naturaleza en cada momento (Fernández-Llario y cols., 1998). En los ecosistemas mediterráneos, la actividad reproductiva de las hembras es prácticamente inexistente durante el periodo estival debido a la escasez de alimentos, reactivándose generalmente a principios de otoño con las primeras precipitaciones y con la caída de la bellota (Santos y cols., 2006). Esta estacionalidad se puede ver alterada en las áreas donde la alimentación está suplementada con alimento proporcionado por el hombre. En este tipo de áreas se puede registrar actividad sexual durante todo el año (Fernández-Llario y cols., 1998).



Imagen 3: Hembra de jabalí plácidamente tumbada amamantando a su camada de rayones.

Las hembras alcanzan su madurez sexual cuando adquieren un peso aproximado de 30 kg, lo que se corresponde con una edad cercana a los 10-11 meses (Sáez-Royuela, 1989). Sin embargo, hay que indicar que muchas hembras de esta edad pueden ver retrasado su primer celo hasta que tienen un año y medio de edad si el ambiente en el que se desarrollan no aporta los suficientes nutrientes

(Fernández-Llario y cols., 2005a). Por su parte, los machos también alcanzan la pubertad aproximadamente a los 10 meses de edad. Sin embargo, estos no presentan una actividad reproductiva importante hasta que no alcanzan el desarrollo suficiente de sus caninos y la fuerza necesaria para competir con los machos dominantes, lo que suele ocurrir a los dos años de edad aproximadamente (Rosell, 1998; Herrero, 2002).

El tamaño medio de la camada en las poblaciones de jabalíes en zonas mediterráneas es de 3.5 crías (Fernández-Llario y cols., 1999). Este valor está bastante influenciado por el tamaño de las hembras, encontrando camadas con un mayor número de crías en hembras más grandes (Sáez-Royuela y cols., 1987). Además, el tamaño de camada parece estar ligado a la cantidad de recursos disponibles en la naturaleza. Así, en las poblaciones del centro de Europa donde los recursos son más abundantes, el tamaño medio de camada es de 5.3 (Rosell y cols., 2001). Dicho esto, podemos intuir que el jabalí adapta su estrategia reproductiva ajustándose a los recursos que encuentra disponibles. En este sentido, se ha comprobado cómo en años lluviosos, en los que estos animales pueden encontrar más recursos, tanto el porcentaje de hembras gestantes como el tamaño de camada son mayores que en años de sequía (Abaigar, 1990; Rosell, 1998; Fernández-Llario y cols., 2000). Por otra parte, se ha comprobado que dentro de una misma camada, la cría con mayor peso al nacimiento suele ser un macho, lo que hace pensar que los esfuerzos reproductivos de las hembras están sesgados en este sentido con un objetivo adaptativo, ya que este macho accederá a la mama con más leche (Fernández-Llario y cols., 1999).

Los nacimientos de las crías de jabalí tienen lugar en parideras excelentemente preparadas por las madres. Estos lugares son verdaderos nidos de cría, contruidos por la propia hembra mediante la acumulación de ramas de los alrededores, a modo de paredes y techo. Estos nidos disponen de una mullida cama formada por materiales vegetales que la misma hembra prepara mascando ramitas finas. La mayor parte de estos nidos de cría se encuentran en las zonas más soleadas de las laderas, en las cercanías de puntos de agua y en lugares en

donde la cobertura vegetal es abundante (Fernández-Llario y cols., 2005b). Los rayones permanecen en los nidos los primeros días y sólo empiezan a salir tras la primera o segunda semana de vida, o incluso antes dependiendo de las condiciones ambientales.

1.1.5 Comportamiento del Jabalí

El jabalí es un animal social, de hábitos nocturnos y que dedica la mayor parte de su actividad a la búsqueda de alimento y a su nutrición (Fernández-Llario, 2006). Este animal interacciona con lo que le rodea principalmente utilizando dos de sus sentidos: el olfato y el oído. El olfato es el sentido más desarrollado y es utilizado sobre todo para la exploración del medio y como herramienta de defensa, ya que les permite detectar posibles depredadores o posibles riesgos a gran distancia (Rosell y cols., 2001). Por su parte, el oído posee una función comunicativa importante permitiendo al jabalí la captación de sonidos emitidos por sus congéneres (Rosell y cols., 2001). La emisión de sonidos es importante a lo largo de varias etapas en la vida del jabalí. Las crías son capaces de indicar a las madres situaciones de alerta o situaciones de hambre, mediante la emisión de sonidos (Weary y cols., 1995; Weary y cols., 1998). Además, los adultos emiten sonidos con los que pueden regular sus comportamientos sociales e incluso sexuales (Fernández-Llario, 1996).

Las poblaciones naturales de jabalíes se componen de diferentes grupos o estructuras familiares dinámicas, con un número variable de individuos que va cambiando cíclicamente dependiendo de la época del año en la que nos encontremos (Fernández-Llario, 1996). De este modo, una estructura familiar típica estaría formada por una hembra adulta, que ejerce las labores de hembra dominante debido a su edad y su experiencia; varias hembras adultas y subadultas, generalmente emparentadas con la hembra dominante a la cual secundan; y las crías menores de un año, tanto machos como hembras (Martínez-Rica, 1981; Fernández-Llario, 1996). Los machos por su parte, se distribuyen alrededor de los grupos matriarcales interactuando con ellos sobre todo en las épocas de celo

(Fernández-Llario, 2006).

En las épocas de baja actividad reproductiva los machos pueden vivir formando grupos de tamaño variable que sobre todo incluyen a machos subadultos, en estructuras más reducidas formadas por un par de individuos o incluso en solitario (Rosell y cols., 2001; Fernández-Llario, 2006). En los ecosistemas mediterráneos es muy típica la estructura formada por un macho dominante y otro subadulto al que denominamos “escudero”, el cual hace las funciones de centinela a la hora de explorar nuevos territorios. Durante la época de celo, los machos dominantes entran en contacto con los grupos matriarcales, desplazando de ellos a los jóvenes machos menores de un año que aún formaban parte del grupo (Fernández-Llario, 2006). Este periodo es el de mayor dinamismo y en el que podemos encontrar una mayor variabilidad en la formación de los grupos en función de las luchas de dominancia entre los machos.

Durante esta época de celo, los machos adultos suelen mostrar unas pautas de comportamiento que incluyen el baño en zonas embarradas conocidas como “bañas”. Estas “bañas”, utilizadas año tras año, se localizan cerca de ríos o arroyos debido a que necesitan agua para su formación (Rosell, 1998). Durante este rito los jabalíes recubren su cuerpo con barro, que forma una película sobre extensas partes del mismo (Imagen 4). Posteriormente, es habitual que los jabalíes froten su cuerpo con los troncos de los árboles cercanos a las bañas, donde dejan impreso parte de este barro.



Imagen 4: Jabalí reposando en una zona embarrada a la que se le denomina “baña”.

Las funciones que el baño desempeña en la vida social del jabalí han sido ampliamente discutidas. Por una parte, se piensa que el barro que los jabalíes dejan impregnado en los troncos podría llevar fijadas parte de las feromonas que los machos secretan en la saliva, favoreciendo de este modo la aparición del celo en las hembras próximas (Fernández-Llario, 2005). Por otra parte, la adquisición de una cubierta de barro podría suponer una herramienta defensiva en las múltiples peleas que continuamente se suceden entre los machos durante la época de celo o, incluso, servir como antiséptico para las heridas que durante este tipo de peleas se producen (Fernández-Llario, 2006). Por último, las funciones del baño pueden ir encaminadas a favorecer la termorregulación (Belden y cols., 1976) o la eliminación de parásitos externos (Rosell y cols., 2001). Sin embargo, esta última idea parece estar casi descartada, ya que en las zonas mediterráneas, la mayor frecuencia de baños sucede en los meses de octubre-noviembre cuando los niveles de ectoparásitos en el jabalí son bajos (Fernández-Llario y cols., 2005a).

1.1.6 Adaptación del jabalí a nuevos hábitats y sistemas de cría

En los últimos años, con el objetivo de satisfacer una mayor demanda de jabalíes, se han explorado nuevos modelos de explotación para este animal. Esto ha propiciado que en muchos casos, el jabalí se haya visto obligado a adaptarse a hábitats diferentes que en algunas ocasiones distan bastante de la zona de campeo natural para esta especie.

La mayor demanda de jabalíes puede deberse a varios motivos, dependiendo de la zona geográfica a la que nos refiramos. Por ejemplo, en países como Finlandia el aumento en el número de granjas y explotaciones intensivas de jabalíes es debido a una mayor demanda de carne procedente de este animal (Hälli y cols., 2012). Por otra parte, en países como España, el interés por la cría del jabalí viene suscitada, sobre todo, por una mayor demanda de animales destinados a la práctica de la caza (Gortázar y cols., 2006).

En cualquier caso, esta situación ha creado la necesidad de utilizar modelos de explotación más eficientes para la cría del jabalí. Estos modelos varían entre

explotaciones en las que los jabalíes son criados en instalaciones similares a las utilizadas para la cría de cerdo doméstico, y fincas en las que la única medida de manejo que se aplica es el suministro de alimentación suplementaria y en las que los jabalíes conservan sus áreas de campeo habituales.

En nuestro país una de las medidas más utilizada ha sido el vallado de fincas, cercando en muchos casos grandes superficies de terreno con el objetivo de evitar la dispersión de los jabalíes que habitan ese área. Esta medida permite tener un control más exhaustivo de la población de jabalíes y facilita que las fincas puedan albergar densidades de jabalíes más elevadas en muchos casos.



Imagen 5: El vallado perimetral es una de las medidas de manejo más extendidas en las fincas de jabalí.

Otra de las medidas más frecuentes es la administración de alimento suplementario a los jabalíes de una determinada zona. Esta medida es sobre todo necesaria en fincas valladas, con una gran densidad de animales, las cuales no ofrecen recursos suficientes para cubrir las necesidades alimentarias de los jabalíes que en ellas habitan. Además, la alimentación suplementaria se puede aplicar con otros fines, como puede ser la atracción de jabalíes a una determinada zona de monte, en la cual se realizará posteriormente una acción cinegética. Los alimentos más utilizados para este tipo de prácticas son cereales como el maíz o la cebada, piensos especialmente elaborados para el mantenimiento de jabalíes o incluso subproductos procedentes de la industria alimenticia. Estos alimentos en muchos casos se suministran en áreas exentas de monte donde son derramados

directamente sobre el suelo; sin embargo, en los últimos tiempos son cada vez más las fincas que cuentan con comederos para suministrar este tipo de alimento. Estos comederos pueden ser específicos para el jabalí, evitando la entrada de otros animales salvajes con los que cohabitan. Incluso, se han diseñado comederos específicos para las crías de jabalíes, con entradas estrechas que excluyen la entrada de adultos y permiten la administración de alimentos más acordes con las necesidades nutricionales de las crías.



Imagen 6: Hembra de jabalí amamantando a sus rayones en un núcleo zoológico de jabalíes dotado de instalaciones similares a las utilizadas para la cría del cerdo doméstico en condiciones intensivas.

Posiblemente, una de las máximas expresiones del avance que ha experimentado el manejo del jabalí la encontremos en los cada vez más numerosos núcleos intensivos o núcleos zoológicos. Estos núcleos se ubican generalmente dentro de explotaciones cinegéticas y tienen como objetivo suministrar jabalíes a la propia finca o a otras, dependiendo de las necesidades cinegéticas. En este tipo de núcleos el control que el hombre ejerce sobre determinados aspectos de la vida del jabalí, como la alimentación o la reproducción son mucho mayores. Presentan comederos y bebederos específicos, y suelen estar dotados de diferentes parcelas y sistemas de manejo que permiten ubicar a los animales en cada una de ellas dependiendo de las necesidades. De este modo, por ejemplo, se pueden controlar los periodos de cubrición, separando los machos de las hembras; o se puede realizar un destete programado, separando

a las crías de las madres. Además, este tipo de explotaciones brinda la oportunidad de aplicar medidas sanitarias individualizadas basadas en la aplicación de vacunas, tratamientos específicos o en la recogida de muestras para diagnóstico de diferentes enfermedades.

1.2 Importancia del jabalí en la actualidad

El jabalí es un mamífero salvaje que ha estado ligado al hombre desde épocas muy antiguas. Actualmente, está considerada como una de las especies cinegéticas más importantes en nuestro país, teniendo una notable repercusión en ámbitos tan importantes como el económico, el social o el sanitario.

1.2.1 Importancia económica

El jabalí se ha consolidado en los últimos años como una de las principales especies cinegéticas. En la pasada década, el número de jabalíes abatidos en cacerías celebradas en España aumentó progresivamente, con un crecimiento anual próximo al 10 % hasta llegar a los 222.658 especímenes abatidos en la temporada 2010-2011 (Garrido, 2012).



Imagen 7: Conjunto de jabalíes abatidos en una acción cinegética celebrada en una de las fincas estudiadas durante el desarrollo de esta tesis.

Este aumento en el número de capturas supuso un mayor impacto de esta especie en la economía nacional. Contabilizar el efecto que la caza del jabalí tiene

en este campo es una tarea complicada, debido principalmente a que el flujo económico generado por las acciones cinegéticas sobre esta especie salpica a una gran cantidad de sectores como el de la industria cárnica, la actividad veterinaria, la taxidermia o la hostelería (Garrido, 2012). Sin embargo, a pesar de la complejidad del asunto, se podrían hacer algunas aproximaciones que nos proporcionarían una idea de la importancia económica de esta actividad.

Posiblemente una de las principales fuentes de ingresos de esta actividad sea el dinero pagado por los cazadores para poder asistir a la acción cinegética. Hoy en día, pese a la crisis económica en la que estamos inmersos, el número de aficionados a la caza, tanto nacionales como extranjeros, dispuestos a gastar una gran cantidad de dinero con el objetivo de abatir un buen jabalí es muy notable. Estimar el montante económico generado por la realización de cacerías de jabalí es muy complicado, debido principalmente a que no existe un registro controlado del abono de tasas por parte de los cazadores para asistir a las acciones cinegéticas. Sin embargo, en estudios recientes se ha estimado que el precio medio que un cazador paga para abatir un jabalí es de 90 €, lo que supondría, teniendo en cuenta el número de capturas, unos ingresos de 20.039.222 € (Garrido, 2012). En las monterías de élite en las que se garantiza una calidad mínima en los jabalíes abatidos, el precio que un cazador paga por abatir uno de estos animales puede superar holgadamente los 500 €.

Otra parte importante de los ingresos de esta actividad se obtienen a raíz de la venta de las canales de los jabalíes abatidos para la elaboración de productos cárnicos. Según las estadísticas oficiales del MAGRAMA, la venta de la totalidad de los jabalíes abatidos entre los años 2005 y 2010 originó unos ingresos superiores a los 55 millones de euros (55.811.238 €) lo que supone una media anual de 11.162.247 € (Ministerio de Agricultura, 2012).

Además, la caza del jabalí afecta a la economía en muchos más aspectos. En primer lugar, ofrece una fuente de ingreso para las administraciones públicas mediante el pago de tasas y licencias que tanto los gestores como los cazadores

tienen que abonar para poder llevar a cabo la actividad cinegética. En segundo lugar, sectores como los de la veterinaria, la taxidermia, la venta de armas y munición, las compañías aseguradoras, la guardería de los cotos de caza o las rehalas y recovas, se benefician en mayor o en menor medida de la caza de este animal. Por último, la realización de acciones cinegéticas sobre el jabalí, disminuye notablemente las pérdidas que estos animales producen por daños en la agricultura, las cuales a buen seguro serían mayores si no existieran este tipo de acciones.

1.2.2 Importancia social

La expansión territorial experimentada por el jabalí en los últimos años en nuestro país está propiciando la colonización por parte de este animal de áreas periurbanas, dando lugar a una mayor interacción entre el jabalí y el ser humano que desemboca en consecuencias sociales, negativas en su gran mayoría (Meng y cols., 2009).

El jabalí como animal en continua adaptación al medio que le rodea, encuentra atractiva la colonización de áreas periurbanas por varios motivos. En primer lugar, encuentra una buena fuente de recursos alimenticios en los desperdicios, sobre todo orgánicos, que el ser humano genera en su actividad diaria (Casas y cols., 2008). Por otra parte, las inmediaciones de los núcleos urbanos suponen una zona de seguridad para el jabalí, ya que generalmente son territorios donde no se llevan a cabo acciones cinegéticas sobre esta especie. Por lo tanto, la presencia del jabalí en estas zonas podría deberse también a una estrategia adaptativa con la finalidad de evitar exponerse a las cacerías (Casas y cols., 2008). De hecho, se ha demostrado que el número de jabalíes alrededor de núcleos urbanos es mayor entre los meses de octubre y febrero, precisamente en los que está permitida la caza del jabalí (Casas y cols., 2008).

La presencia de poblaciones de jabalíes en núcleos urbanos generalmente desemboca en consecuencias negativas que pueden dar lugar a una verdadera alarma social. Dentro de los principales problemas que acarrearán estos animales

podríamos destacar el riesgo que supone su presencia en las vías de circulación. El jabalí es un animal de hábitos nocturnos y que recorre grandes distancias en busca de fuentes de alimento. Este hecho hace que la presencia nocturna de jabalíes en las carreteras sea una constante en determinadas zonas, con el peligro que esto supone para la circulación. Así, son numerosos los accidentes de tráfico atribuidos a estos animales y que han tenido consecuencias más o menos graves dependiendo del caso (Rodríguez-Morales y cols., 2013).



Imagen 8: Jabalíes en zonas urbanas. A) Jabalí intentando encontrar alimento en depósitos de basura situados en una zona periurbana. B) Jabalíes provocando daños en zona ajardinada de alguna ciudad.

Otro inconveniente de la adaptación de estos animales a zonas periurbanas es la posibilidad de que se desarrollen ataques tanto a personas como a animales domésticos. El jabalí, por su comportamiento natural, tiende a huir cuando intuye que algún peligro se está aproximando. Sin embargo, cuando siente que su integridad está comprometida y la huida no es la mejor estrategia, puede tomar una actitud agresiva resultando muy peligroso. Así, se podrían dar situaciones de ataques por parte del jabalí. No obstante, se han documentado multitud de ataques a personas y animales domésticos, generalmente de escasa gravedad, en muchos puntos de la geografía española (Casas y cols., 2008).

Por último, la interacción de este animal con el medio urbano puede desembocar en daños materiales. En su afán por conseguir alimento, el jabalí puede producir daños en sitios públicos como parques y jardines; en propiedades privadas como huertos dedicados al autoconsumo o jardines privados; o en el

mobiliario urbano, sobre todo en papeleras y contenedores que pueden albergar alimento (Casas y cols., 2008). Si bien este tipo de daños, no parecen ser muy graves, pueden tener repercusiones sociales y económicas cuando se repiten con mucha frecuencia, cosa que ocurre en bastantes áreas de nuestra geografía.

1.2.3 Importancia sanitaria

El jabalí ha adquirido una gran importancia sanitaria en las últimas décadas, debido principalmente a dos motivos. Por una parte, se ha puesto de manifiesto que el jabalí puede albergar una gran cantidad de patógenos en su organismo que pueden producir enfermedad tanto en los humanos como en otras especies animales (Meng y cols., 2009). Por otro lado, el incremento generalizado del número de estos animales ha multiplicado las probabilidades de contacto directo con otras especies animales, incluida la humana, generándose un ambiente propicio para la transmisión de patógenos a otras especies (Gibbs, 1997).

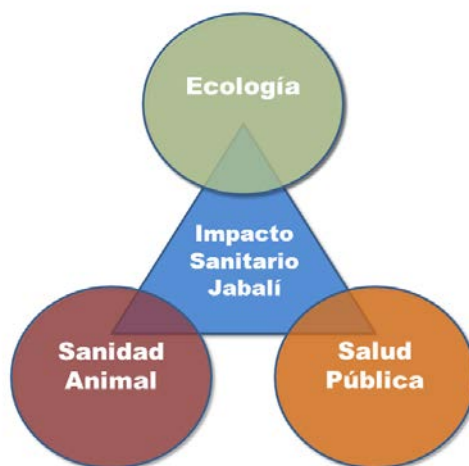


Imagen 9: Diagrama explicativo de los diferentes ámbitos que se ven afectados por la presencia de patógenos infecciosos en el jabalí.

De este modo, podemos decir que la presencia de determinados patógenos en el jabalí puede suponer un riesgo sanitario por varias vías. En primer lugar, el jabalí puede suponer un riesgo para la salud pública ya que puede actuar como reservorio y transmitir patógenos que afectan gravemente a los humanos (Wacheck, 2010). En segundo lugar, supone un riesgo para la sanidad animal ya

que puede albergar y diseminar patógenos que producen enfermedad en otros animales domésticos con los que puede entrar en contacto (Meng y cols., 2009). Por último, la presencia de determinados patógenos en el jabalí puede suponer un riesgo ecológico, ya que podría comprometer el estatus sanitario de las poblaciones de este animal y de otras especies salvajes que cohabitan con él.

1.2.3.1 Repercusiones sanitarias para la salud pública

Las zoonosis son enfermedades presentes en los animales que pueden ser transmitidas a los humanos, por lo que suponen un riesgo para la salud pública (Navarro-González, 2013). La fauna salvaje es capaz de transmitir numerosos patógenos zoonóticos a los humanos. De hecho, gran cantidad de las enfermedades emergentes que afectan a los humanos en la actualidad, son zoonosis procedentes de reservorios silvestres (Jones y cols., 2008). Entre los agentes zoonóticos que puede albergar el jabalí destacan bacterias re-emergentes como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. o *Escherichia coli* (Díaz-Sánchez y cols., 2013); virus como el virus de la hepatitis E (de Deus y cols., 2008) y el virus de la encefalitis japonesa (Yang y cols., 2013); o parásitos como *Trichinella* spp. (Gamito-Santos y cols., 2009) y *Toxoplasma gondii* (Calero-Bernal y cols., 2013).

Las vías de transmisión de estos patógenos entre el jabalí y los humanos dependen del agente al que nos estemos refiriendo; sin embargo se pueden resumir en dos:

a) La principal es el consumo de carne procedente de canales contaminadas con algún patógeno durante el proceso de elaboración (Van Campen y cols., 2010). En muchas ocasiones la calidad higiénica de la carne procedente de estos animales no es la más adecuada, debido a que el faenado de las canales se realiza al aire libre y no siempre en muy buenas condiciones, lo que facilita contaminaciones con agentes patógenos (Díaz-Sánchez y cols., 2013). Además, se ha comprobado que la ubicación del disparo que produce la muerte del animal también puede alterar la calidad higiénica de la canal, teniendo más posibilidades de encontrar una canal contaminada si el disparo afectó la cavidad

abdominal del animal (Avagnina y cols., 2012).

b) La otra vía de transmisión podría ser el contacto directo con superficies y materiales contaminados por excreciones procedentes de estos animales, o el consumo de agua contaminada por este tipo de excretas (Van Campen y cols., 2010). Esta de vía de contagio puede ser más frecuente en colectivos de personas que trabajan en contacto directo con este tipo de animales como veterinarios, carniceros, taxidermistas o guardas (Massey y cols., 2011). Sin embargo, la posibilidad de un contagio por contacto directo entre jabalí y humano se va ampliando día a día a otros sectores de la sociedad. Como hemos comentado anteriormente, la colonización de núcleos urbanos por parte de los jabalíes favorece las interacciones entre los humanos y estos animales. Así, es habitual que los jabalíes que habitan en zonas periurbanas, se alimenten y defecuen en áreas públicas o jardines privados y se abastezcan de agua en fuentes públicas y privadas, pudiendo de este modo, depositar sus excreciones en lugares frecuentemente habitados por los humanos y provocando un riesgo de transmisión de patógenos entre ambas especies (Casas y cols., 2008; Navarro-Gonzalez y cols., 2013).

1.2.3.2 Repercusiones sanitarias en sanidad animal

La transmisión de patógenos entre la fauna salvaje y el ganado doméstico es un problema cuya dimensión ha aumentado notablemente en los últimos años en muchos países de Europa (Navarro-Gonzalez y cols., 2013). Este incremento podría ser fruto de varios factores. En primer lugar, la expansión territorial de la población humana ha propiciado que grandes poblaciones de animales salvajes se hayan visto concentradas en pequeñas áreas naturales aumentando notablemente su densidad (Gummow, 2010). Por otra parte, este incremento en la abundancia de animales salvajes se ha visto favorecido en muchos casos por la acción del hombre, el cual emplea sistemas de manejo encaminados a aumentar su densidad poblacional para poder satisfacer las necesidades del mercado (Gortázar y cols., 2007). Además, el aumento de zonas boscosas en detrimento de áreas

tradicionalmente agrícolas puede proporcionar cobijo y recursos a las poblaciones salvajes (Martin y cols., 2011). Finalmente, a todo esto hay que sumar el aumento en el número de explotaciones extensivas de ganado doméstico que se está produciendo en muchos lugares fruto de la demanda de productos cárnicos más naturales por parte de los consumidores y de las propias administraciones (Gortázar y cols., 2007). Este tipo de explotaciones extensivas puede facilitar notablemente la interacción entre animales salvajes y domésticos.

Entre los animales salvajes que pueden suponer un riesgo sanitario para la cabaña doméstica, el jabalí ocupa uno de los primeros puestos del escalafón. Este animal ha sido señalado como reservorio de gran cantidad de patógenos que afectan a la cabaña doméstica. Así, entre los patógenos más importantes que se han detectado en el jabalí se encuentran bacterias, como *Brucella suis* (Muñoz y cols., 2010), o *Mycobacterium bovis* (Parra y cols., 2003); y virus, como el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) (Ruiz-Fons y cols., 2007), el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Vicente y cols., 2004), el virus de la peste porcina clásica (Leuenberger y cols., 2007) o el virus del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino (PRRSV) (Rodríguez-Prieto y cols., 2013), entre otros.

Los problemas que el jabalí puede provocar en materia de sanidad animal alcanzan su máxima expresión cuando este actúa como transmisor de enfermedades consideradas erradicadas en la cabaña doméstica (Meng y cols., 2009). Uno de los ejemplos más claros para definir esta situación es el que ocurre con la brucelosis porcina en Europa. En las últimas décadas se han descrito brotes de esta enfermedad en granjas de porcino doméstico pertenecientes a países en los que la enfermedad se consideraba erradicada o en los que no se había registrado ningún caso como Dinamarca, Francia o Alemania (Godfroid y cols., 2002). La aparición de este tipo de brotes ha sido atribuida a la presencia de reservorios de *Brucella suis* en las poblaciones de jabalíes de estos países (Cvetnic y cols., 2009), ya que la capacidad de transmisión de esta bacteria por parte del jabalí al cerdo doméstico ha sido demostrada en repetidas ocasiones (Godfroid y cols., 1994; Andersen y cols., 1995).

Otras de las situaciones en las que el jabalí ocasiona serios problemas de sanidad animal son aquellas en las que actúa como reservorio o transmisor de enfermedades en vías de erradicación en la cabaña doméstica, complicando notablemente esta tarea. Esta situación se ve perfectamente reflejada en España con la tuberculosis bovina (Hermoso de Mendoza y cols., 2006). Dicha enfermedad, provocada por *Mycobacterium bovis*, se intenta erradicar de la cabaña bovina española desde hace 49 años. En este periodo, se ha conseguido disminuir la prevalencia notablemente, llegando a alcanzarse los objetivos deseados en algunas zonas de España (Ministerio de Agricultura, 2011). Sin embargo, actualmente la prevalencia de tuberculosis bovina sigue siendo relativamente alta en determinadas zonas de nuestro país (Allepuz y cols., 2011), que precisamente coinciden con las áreas geográficas en las que encontramos una mayor abundancia de jabalíes (Gortázar y cols., 2005). Estudios epidemiológicos llevados a cabo en nuestro país han puesto de manifiesto que la presencia de altas prevalencias de tuberculosis en el jabalí es uno de los factores de riesgo más importantes para la aparición de brotes de esta enfermedad en el ganado bovino (Rodríguez-Prieto y cols., 2012). Estos hallazgos sugieren que el jabalí está actualmente interfiriendo en las tareas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino.

La transmisión de enfermedades entre los animales salvajes y los domésticos depende de factores tanto espaciales como temporales, que pueden variar dependiendo del tipo de agente patógeno implicado, de la necesidad de vectores para la transmisión u otros factores (Bengis y cols., 2002). De este modo, parece lógico pensar que el contagio de enfermedades entre animales salvajes y domésticos es más probable cuando estos comparten pastos y puntos de agua en sus zonas de campeo (Boehm y cols., 2007). Este hecho facilita que los animales domésticos puedan entrar en contacto con excreciones emitidas por la fauna salvaje y viceversa (Van Campen y cols., 2010). En este escenario, el jabalí parece cumplir todos los requisitos necesarios para suponer un constante riesgo sanitario para la cabaña doméstica. Debido a su carácter oportunista y a la facilidad que

tiene para desplazarse en busca de alimento, el jabalí se mueve por zonas habitualmente ocupadas por ganado doméstico, accediendo a los puntos de alimentación o de abastecimiento de agua (Hermoso de Mendoza y cols., 2006). Además el jabalí, puede entrar en contacto directo con los animales domésticos, sobre todo con el cerdo, con el cual puede incluso reproducirse, lo que podría suponer una vía adicional de contagio (Cvetnic y cols., 2009).



Imagen 10: El jabalí comparte habitualmente zonas de campeo con el ganado doméstico criado en extensivo.

Esta situación crea la necesidad de explorar y evaluar medidas que sean útiles a la hora de reducir el impacto del jabalí como reservorio de patógenos que afectan a los animales domésticos. Estas medidas pueden ir encaminadas a evitar el contacto entre el jabalí y los animales domésticos mediante la utilización de barreras físicas (Barasona y cols., 2013), a reducir las prevalencias de estos patógenos en las poblaciones de jabalíes mediante medidas de control (García-Jiménez, 2013), o simplemente encaminadas a la reducción en el número de estos animales disminuyendo de este modo las posibilidades de contagio (Boadella y cols., 2012; García-Jiménez y cols., 2013).

1.2.3.3 Repercusiones ecológicas

La presencia de determinados patógenos en el jabalí también podría tener importantes repercusiones ecológicas. En primer lugar, gran cantidad de los agentes infecciosos que afectan a este animal pueden tener repercusiones

sanitarias en otras especies salvajes. Así, uno de los ejemplos más conocidos es el de *Mycobacterium bovis* que puede encontrarse tanto en el jabalí como en otras muchas especies que cohabitan con él, tales como el ciervo o el gamo (García-Jiménez y cols., 2013).

Por otro lado, algunos de los patógenos del jabalí podrían repercutir en el estatus sanitario de las poblaciones de este animal alterando el número de individuos debido a la aparición de mortalidades. No obstante, entre los patógenos detectados en esta especie, se encuentran muchos de los que mayor impacto económico y sanitario tienen en las explotaciones de porcino doméstico.

En los últimos años se han descrito brotes de algunas de las enfermedades típicas del cerdo doméstico en poblaciones de jabalí, destacando, entre otras, la enfermedad de Aujeszky (Gortázar y cols., 2002) o el síndrome de desmedro postdestete provocado por PCV2 (Lipej y cols., 2007). Estas enfermedades mostraron en general patrones clínicos similares a los descritos previamente en el cerdo doméstico, y su descripción ha ayudado a comprender algo mejor cómo estos patógenos pueden influir en las poblaciones de jabalí. Sin embargo, las repercusiones sanitarias que tienen la gran mayoría de los patógenos detectados en esta especie son aún desconocidas.

Por otra parte, los nuevos sistemas de explotación que se están empleando para la cría del jabalí podrían agravar las consecuencias clínicas de determinadas infecciones o propiciar la aparición de enfermedades no descritas hasta la fecha en el jabalí. En estos sistemas, el jabalí se ve sometido en mayor o menor medida a la acción del hombre, que aplica medidas como el vallado o la alimentación suplementaria. En muchos de estos modelos de producción encontramos elevadas densidades de individuos junto a otros problemas que vienen derivados de la escasa higiene, la mezcla de animales de distinto origen o edades, o el estrés que genera cualquier tipo de manejo en esta especie salvaje. Esta situación podría provocar la aparición de enfermedades estrechamente ligadas a estos factores ambientales y de manejo. Además, la presencia de estos factores podría dar lugar

a la aparición de formas clínicas inéditas o simplemente más graves de algunas de las enfermedades descritas anteriormente en esta especie, aumentando de este modo su impacto poblacional.

La utilización de estos modelos de explotación más intensivos es fruto de la mayor demanda de jabalíes, que por diversos motivos se está generando en muchos países (Gortázar y cols., 2006; Hälli y cols., 2012). En este tipo de explotaciones, en las que se invierten grandes cantidades de dinero, la aparición de brotes de algunas enfermedades puede tener graves repercusiones económicas, sumadas a las ya de por sí importantes repercusiones ecológicas.

Esta compleja situación crea la necesidad de ampliar los conocimientos actuales acerca de las repercusiones que muchos de los patógenos detectados tienen sobre el estado sanitario de las poblaciones de jabalí, con el objetivo de comprender su efecto y poder elaborar estrategias de control y prevención que reduzcan su impacto tanto sanitario como económico.

1.3 Estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí

El estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí es un campo relativamente nuevo que nació fruto de las sospechas que indicaban que este animal podía actuar como reservorio y vehículo transmisor de determinados agentes infecciosos allá por los años 50-60 (Lepine y cols., 1950; Simintzis, 1964). Hoy en día, la importancia sanitaria del jabalí es sobradamente conocida y puede afectar tanto al ámbito de la salud pública, como al de la sanidad animal o el de la ecología. Por ello, el estudio de este tipo de enfermedades está más que justificado.

Sin embargo, se pueden plantear una serie de preguntas básicas acerca del estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí. Algunas de ellas podrían ser: “¿Qué enfermedades infecciosas se deben estudiar en el jabalí?” o “¿Cómo se estudian las enfermedades infecciosas en este animal?”. Para responder este tipo de cuestiones hay que realizar un pequeño análisis de lo que ha supuesto la

investigación de las enfermedades infecciosas en el jabalí en los últimos años.

En el siguiente gráfico se representa el número de trabajos científicos publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Report Index (JCR)*, obtenido tras realizar una búsqueda en la que la palabra “wild boar”, se combina con el nombre de algunas de las principales enfermedades o agentes infecciosos que afectan a este animal. Los resultados reflejados en el siguiente gráfico representan el número de trabajos científicos que estaban publicados a la finalización del año 2000 y del año 2013 para cada una de las búsquedas realizadas.

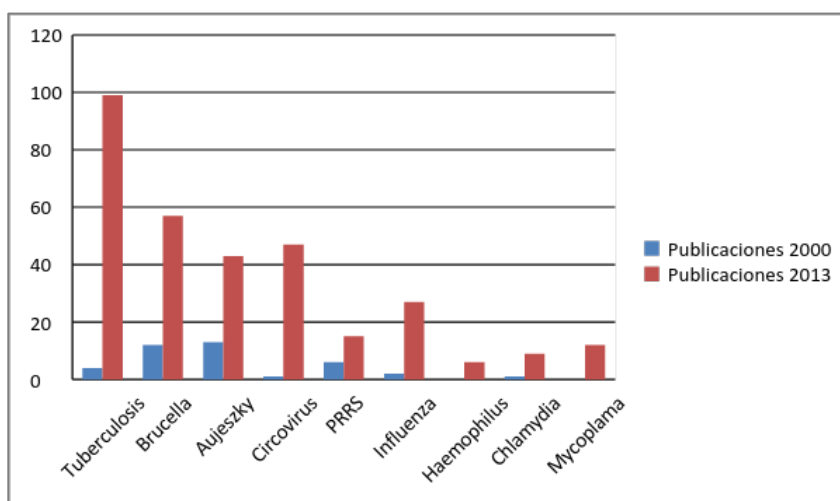


Imagen 11: Número de trabajos científicos realizados sobre determinados patógenos infecciosos en jabalí y que habían sido publicados en los años 2000 (azul) y 2013 (rojo).

Del análisis de este gráfico podemos obtener información útil para responder las preguntas formuladas anteriormente. En primer lugar, podemos observar cómo el número de trabajos publicados varía notablemente dependiendo del patógeno elegido. Así, mientras que actualmente podemos encontrar 99 trabajos en los que se hace referencia al jabalí y la tuberculosis, aparecen por ejemplo, sólo 6 que relacionan a este animal con *Haemophilus spp.* Esto nos indica que no todas las enfermedades o patógenos han sido estudiados con igual profundidad en este animal hasta la fecha, y que se ha dedicado un mayor esfuerzo al estudio de enfermedades en las que el jabalí podría jugar un papel

epidemiológico más importante.

Sin embargo, los criterios que determinan qué enfermedades infecciosas son las que se estudian en el jabalí no son fijos y pueden variar dependiendo de las necesidades. En el gráfico podemos observar cómo, mientras que en el año 2000 el número de publicaciones que vinculaban las palabras “tuberculosis” y “jabalí” eran escasas, suponiendo apenas la mitad de las que lo hacían con otros agentes como ADV o *Brucella* spp.; en el año 2013 la tuberculosis es la enfermedad más estudiada en este animal prácticamente duplicando en el número de publicaciones a estos mismos agentes. Por el contrario, algunos patógenos como el PRRSV, de los más estudiados en el jabalí a principios de siglo, actualmente apenas cuenta con 9 publicaciones más que en el año 2000, posiblemente debido a las escasas prevalencias encontradas que hacen que su importancia parezca limitada. De todo esto podemos extraer que los criterios que dictaminan cuáles son las enfermedades infecciosas más estudiadas en el jabalí varían dependiendo de los conocimientos generados en las investigaciones previas, inclinándose hacia las enfermedades en las que el jabalí podría tener una mayor relevancia.

Incluso podemos comprobar cómo a principios de este siglo, algunos patógenos entre los que se encuentran las bacterias pertenecientes a los géneros *Mycoplasma* y *Haemophilus* no habían sido aún relacionados con el jabalí, mientras que ahora, existen algunos trabajos que detallan su implicación en esta especie. Este hecho nos indica que las enfermedades infecciosas estudiadas en el jabalí no son estáticas y su número va aumentando dependiendo de los hallazgos encontrados.

El estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí ha dado lugar a una amplia gama de trabajos científicos. Estos van desde los que describen la presencia de anticuerpos frente a un microorganismo en esta especie animal (Yang y cols., 2013), a los que realizan sofisticados estudios epidemiológicos encaminados a encontrar medidas de control para reducir las prevalencias de un determinado patógeno en las poblaciones de jabalíes (Boadella y cols., 2012; Barasona y cols.,

2013; García-Jiménez y cols., 2013), pasando por los que describen brotes de alguna enfermedad (Cuesta y cols., 2013) o los que se centran en la presencia de resistencias antibióticas en bacterias halladas en este animal (Navarro-González y cols., 2013).

Esta heterogeneidad posiblemente sea fruto del diferente nivel de conocimiento que se tiene acerca de los patógenos infecciosos del jabalí. Así, los últimos trabajos realizados sobre enfermedades ampliamente estudiadas en esta especie como la tuberculosis, se centran en la descripción de nuevas situaciones epidemiológicas o en la aplicación de medidas de control de la enfermedad (García-Jiménez y cols., 2012b; Muñoz-Mendoza y cols., 2013), mientras que aquellos que versan sobre patógenos recientemente descubiertos en el jabalí se limitan a hacer una descripción de los últimos hallazgos (Reuter y cols., 2012).

Por todos estos motivos, podemos decir que el estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí es un proceso dinámico, que se adapta a las necesidades temporales y en el que tienen cabida diversos tipos de trabajos científicos, con un distinto grado de complejidad dependiendo de la enfermedad estudiada, pero con un objetivo común: ampliar los conocimientos acerca de los agentes infecciosos en este animal con el fin de reducir su impacto sanitario.

Objetivos y estructura de la tesis

2. Objetivos y estructura de la tesis

Como hemos comentado en los apartados anteriores, los conocimientos referentes a las enfermedades infecciosas que afectan al jabalí han aumentado notablemente en los últimos años. Sin embargo, los problemas sanitarios que actualmente genera la presencia de determinados patógenos en este animal, crean la necesidad de seguir investigando en este campo.

Precisamente, fruto de esta necesidad nace la presente tesis doctoral en la cual se presentan una serie de trabajos científicos centrados en el estudio de diferentes enfermedades infecciosas que afectan al jabalí. Con el desarrollo de la misma se pretende aumentar los conocimientos referentes a algunos de los agentes infecciosos más conocidos y relevantes en esta especie, tales como *Brucella suis* o *Mycobacterium bovis*, enfocando su estudio de una manera original y siempre con el objetivo último de obtener herramientas útiles para la lucha frente a estos microorganismos. Por otra parte, en este trabajo se exploran las repercusiones clínicas que otros patógenos infecciosos, menos frecuentes o desconocidos hasta la fecha en el jabalí, pueden producir en este suido salvaje, valorando a su vez, la aplicación de medidas de control para limitar esas repercusiones sanitarias.

De este modo, podemos decir que los objetivos específicos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- Valorar el impacto sanitario de determinados patógenos infecciosos del jabalí, tales como *Brucella suis* o los agentes asociados al Complejo Respiratorio Porcino, cuyas repercusiones clínicas no han sido aún bien definidas en esta especie animal (Bloque I: Estudios 1 y 2).
- Definir la situación epidemiológica de las poblaciones de jabalíes encuadradas en el área de estudio frente a *Brucella suis*, señalando los factores de riesgo asociados a la presencia de este microorganismo, con el fin de proponer medidas de lucha frente a este patógeno basadas en el

control de dichos factores (Bloque I: Estudio 1).

- Determinar si el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí se ve influido por la presencia de infecciones concomitantes por circovirus porcino tipo 2, valorando si dicha relación tiene un reflejo epidemiológico, afectando a la distribución de la tuberculosis en las poblaciones de jabalíes estudiadas (Bloque II: Estudio 1).
- Comprobar si el contacto con determinados patógenos altamente prevalentes en las poblaciones de jabalí (virus, bacterias y parásitos) puede agravar los casos de tuberculosis hallados en este animal, determinando cuales de estos agentes influyen en el desarrollo de esta enfermedad, con el objetivo final de proponer la utilización de medidas de control frente a estos patógenos que pudieran ser útiles en la lucha frente a la tuberculosis (Bloque II: Estudio 2).
- Realizar una descripción detallada de las enfermedades infecciosas detectadas como causas de mortalidad en poblaciones de jabalíes del área de estudio, valorando la aplicabilidad y el éxito de medidas de control frente a estas enfermedades (Bloque III: Estudios 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han escrito un total de 10 trabajos científicos, independientes entre sí, pero con la finalidad común de cumplir uno o más de los objetivos descritos. Precisamente estos objetivos y la metodología empleada en cada uno de los estudios presentados permiten establecer un esquema coherente de exposición de dichos trabajos agrupándolos en tres capítulos o bloques:

Bloque I: "Estudio de las repercusiones clínicas provocadas por determinados patógenos infecciosos en las poblaciones de jabalí. Situación epidemiológica y medidas de control"

En este bloque se presentan dos trabajos en los que se realiza el tipo habitual de muestreo y análisis sobre jabalíes abatidos en diferentes acciones cinegéticas. Estos dos trabajos pretenden valorar las repercusiones clínicas de las infecciones por algunos de los patógenos más importantes para las poblaciones de jabalí como *Brucella suis* o

los patógenos involucrados en el desarrollo del Complejo Respiratorio Porcino. Además, en algunos casos, este tipo de muestreos nos permite establecer factores de riesgo epidemiológicos y proponer medidas de manejo útiles a la hora de reducir las prevalencias de estos agentes en las poblaciones de jabalí. Los estudios incluidos en este bloque son los siguientes:

1.- *High-Density dependence but low impact on selected reproduction parameters of Brucella suis Biovar 2 in wild boar hunting estates from south-western Spain.* D. Risco, A. García, E. Serrano, P. Fernandez-Llario, J. M. Benítez, R. Martínez, W. L. García and J. Hermoso de Mendoza (2013) *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI: 10.1111/tbed.12060.

2.- *Pathological observations of Porcine Respiratory Disease Complex in the wild boar.* D. Risco, J. M. Cuesta, P. Fernández-Llario, J. Salguero, P. Gonçalves, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, R. Velarde, M. Hermoso de Mendoza, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza. *Veterinary Pathology. Under review.*

Bloque II: “Efecto de las infecciones concomitantes por diferentes patógenos en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Consecuencias sanitarias e implicación en medidas de control”.

Este bloque incluye dos trabajos realizados sobre animales abatidos en diferentes acciones cinegéticas. Su objetivo principal es valorar la presencia de infecciones mixtas (por más de un patógeno) o coinfecciones en los individuos analizados y determinar los efectos que estos agentes ejercen sobre el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Los resultados obtenidos en estos artículos permiten proponer medidas de control frente a varios de estos patógenos con el objetivo de reducir las prevalencias de tuberculosis en las poblaciones de jabalí. Dentro de este bloque se incluyen los siguientes trabajos:

1.- *Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations.* D. Risco, P. Fernandez-Llario, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, J.M. Cuesta, R. Martínez, C. Sanz, M. Sequeda, L. Gómez, J. Carranza and J. Hermoso de

Mendoza (2013) *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 121-127.

2.- *Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar*. D. Risco, E. Serrano, P. Fernández-Llario, J. M. Cuesta, P. Gonçalves, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, R. Cerrato, R. Velarde, L. Gómez, J. Segalés, J. Hermoso de Mendoza. *PLoS One*. *Under Review*.

Bloque III: “Estudio descriptivo de diferentes brotes de enfermedades infecciosas en poblaciones de jabalí. Marco epidemiológico y aplicación de medidas de control”.

Este último bloque engloba un total de seis trabajos en los que se describen detalladamente brotes de enfermedades infecciosas acontecidos en diversas poblaciones de jabalí. A diferencia de los anteriores, estos estudios no se basan en hallazgos sobre muestras de animales abatidos en acciones cinegéticas, sino que se inician por la detección de mortalidades “naturales” en diferentes poblaciones de jabalí. Con ellos se pretende dar a conocer enfermedades que, en muchas ocasiones, no habían sido descritas en esta especie salvaje. Sin embargo, el objetivo de estos trabajos no es meramente descriptivo, sino que en muchos de ellos se analizan las situaciones epidemiológicas que pueden llevar a la aparición de estos brotes y se proponen medidas de control para luchar frente a tales enfermedades. Los seis trabajos incluidos en este bloque son:

1.- *Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain*. D. Risco, P. Fernández Llario, R. Velarde, W.L. García, J.M. Benítez, A. García, F. Bermejo, M. Cortés, J. Rey, J. Hermoso de Mendoza, L. Gómez (2011) *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 445-450.

2.- *Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (Sus scrofa) population from southwest Spain*. D. Risco, P. Fernández-Llario, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, M. Gil, P. Gonçalves, R. Martínez, L. Gómez, A. García, J. Rey, M. Hermoso de Mendoza, J. Hermoso de Mendoza (2013) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 791-794.

3.- *Fatal case of Streptococcus suis infection associated to high mortality in a wild boar population from South-Western Spain.* D. Risco, P. Fernández-Llario, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, M. Gil, R. Martínez, A. García, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza. *Journal of Wildlife Diseases. Under Review.*

4.- *A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate.* D. Risco, P. Fernández-Llario, R. Velarde, J.M. Cuesta, W.L. García-Jiménez, P. Gonçalves, M. Gil, A. García, J. Rey, L. Gómez, J. Hermoso de Mendoza (2013) *Journal of Swine Health and Production*, 21, 304-308.

5.- *Ocular lesions associated with Chlamydia suis in a wild boar piglet (*Sus scrofa*) from a semi-free range population in Spain.* D. Risco, A. García, P. Fernández-Llario, W.L. García, J.M. Benítez, P. Gonçalves, J.M. Cuesta, L. Gómez, J. Rey, J. Hermoso (2013) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44, 159-162.

6.- *Isolation of Aeromonas hydrophila in the respiratory tract of wild boar: Pathological implications.* D. Risco, P. Fernández-Llario, J. M. Cuesta, J. M. Benítez-Medina, W. L. García-Jiménez, R. Martínez, P. Gonçalves, J. Hermoso de Mendoza, L. Gómez, A. García (2013) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44, 1090-1093.

Cada uno de estos bloques temáticos está formado por dos partes. En la primera parte se realiza una contextualización de los estudios que se han incluido en cada bloque, poniendo de manifiesto los motivos por los cuales esos trabajos han sido aunados en la misma sección y describiendo los principales objetivos de los mismos. En la segunda parte de cada bloque, se adjuntan los artículos publicados en revistas de impacto que se corresponden con los estudios incluido en el bloque, respetando el formato e idioma de la revista en la que han sido publicados. En el caso de los trabajos que se encuentran en vías de publicación, se adjunta una versión completa del artículo enviado a publicar, de igual modo, respetando el idioma y el formato de la revista a la que han sido enviados. Todos estos trabajos van precedidos de una detallada descripción en castellano en la que se pone de manifiesto la importancia de cada uno de ellos, la metodología empleada para su realización, los principales resultados obtenidos y la interpretación de dichos resultados.

Una vez presentados los trabajos que integran cada uno de los tres bloques, se realiza una discusión general en la que se abordan, de una manera conjunta, los resultados obtenidos en los estudios incluidos en la tesis. En esta sección se valora la aplicabilidad de los resultados obtenidos y se discuten sus limitaciones, proponiendo nuevas investigaciones que serían necesarias para solventarlas.

Por último, se exponen las principales conclusiones obtenidas tras la realización de esta tesis, siempre teniendo en cuenta los objetivos generales propuestos al inicio de la misma.

Bloque I

Estudio de las repercusiones clínicas provocadas por determinados patógenos infecciosos en las poblaciones de jabalí. Situación epidemiológica y medidas de control

3. Bloque I: Estudio de las repercusiones clínicas provocadas por determinados patógenos infecciosos en las poblaciones de jabalí. Situación epidemiológica y medidas de control

El jabalí ha sido señalado como reservorio de gran cantidad de patógenos infecciosos que pueden afectar a otras especies animales, entre las que se incluye el hombre (Wacheck, 2010). Debido a esto, está considerado como una especie de gran importancia sanitaria, lo que ha suscitado que, en los últimos años, el número de estudios que versan sobre los patógenos infecciosos que afecta a este animal se haya multiplicado (Gortázar y cols., 2007).

La inmensa mayoría de estos trabajos se basan en muestreos de animales abatidos en cacerías tradicionales denominadas “monterías”. Este tipo de muestreos permiten acceder a un amplio número de animales, dando lugar a un gran volumen de información. El estudio de animales abatidos en monterías permite valorar, por ejemplo, las consecuencias lesionales que las infecciones con determinados patógenos producen en el jabalí (García-Jiménez y cols., 2012a). Por otra parte, en muchas ocasiones, los animales abatidos en monterías suponen una muestra representativa de la población en la que previamente se incluían, por lo que su estudio permite sacar conclusiones epidemiológicas. Así, mediante este tipo de trabajos podemos definir prevalencias o factores de riesgo asociados a la presencia de un determinado patógeno (Muñoz y cols., 2010).

La realización de este tipo de estudios ha permitido aumentar en gran medida los conocimientos referentes a importantes patógenos infecciosos que afectan al jabalí, tales como *Mycobacterium* spp. (García-Jiménez, 2013), *Brucella suis* (Muñoz y cols., 2010) o el virus de la enfermedad de Aujeszky (Ruiz-Fons y cols., 2007). Sin

embargo, algunas cuestiones sobre la epidemiología y las consecuencias clínicas que determinados patógenos producen en esta especie, aún deben ser esclarecidas.

En este capítulo se presenta dos estudios en los que, utilizando el sistema de muestreo típico, basado en el análisis de animales abatidos en monterías, se pretende esclarecer las repercusiones lesionales ocasionadas por determinados agentes infecciosos que pueden afectar al jabalí, como *Brucella suis* o los principales patógenos respiratorios involucrados en el desarrollo del Complejo Respiratorio Porcino.

3.1 Elevada dependencia de la densidad poblacional pero bajo impacto en los índices reproductivos de *Brucella suis* Biovar 2 en fincas de jabalíes del suroeste español (*High-Density dependence but low impact on selected reproduction parameters of *Brucella suis* Biovar 2 in wild boar hunting estates from south-western Spain*)

Brucella suis (*B. suis*) es el agente causal de la brucelosis porcina, enfermedad que se caracteriza por la aparición de fallos reproductivos en las hembras y orquitis en los machos, dando lugar a importantes pérdidas económicas en las explotaciones afectadas (MacMillan y cols., 2006; Algiers y cols., 2009).

El número de brotes de brucelosis porcina ha aumentado significativamente en las últimas décadas en algunos países europeos como Francia o Alemania (Godfroid y cols., 2002). La aparición de estos brotes ha sido vinculada a la presencia de reservorios salvajes como el jabalí o la liebre (Cvetnic y cols., 2009). No obstante, la transmisión de *B. suis* del jabalí al cerdo domésticos es un hecho contrastado (Godfroid y cols., 1994; Andersen y cols., 1995).

Pese a la importancia de esta especie como reservorio de *B. suis*, hasta la fecha se han realizado pocos esfuerzos para comprender los factores de riesgo que se asocian con la presencia de este patógeno en el jabalí. Por otra parte, los efectos reproductivos que producen las infecciones con *B. suis* en esta especie no están completamente claros. Así, aunque parece que las infecciones por *B. suis* biovar (bv) II producen escasos efectos en los parámetros reproductivos de las hembras (Ruiz-Fons y cols., 2006), las repercusiones de este tipo de infecciones aún no se han valorado en los machos de jabalí.

De este modo, los objetivos de este trabajo fueron: I) determinar qué factores de riesgo (ambientales, individuales o relacionados con la acción del hombre) están asociados con la probabilidad de padecer una infección por *B. suis* en el jabalí; y II)

evaluar los efectos que el contacto con *B. suis* produce en los parámetros reproductivos de hembras y machos de jabalíes.

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 204 jabalíes abatidos en 11 fincas ubicadas en la comunidad Autónoma de Extremadura y repartidas en tres zonas geográficas diferenciadas: Las Hurdes, Monfragüe y Sierra de San Pedro (Imagen 12). En todas estas fincas se determinó la densidad de jabalíes mediante conteo directo de los animales en los puntos de comida. Además se determinó la presencia o no de cerdos domésticos en cada una de ellas.



Imagen 12: Localización de las 11 fincas incluidas en este estudio. Las fincas estudiadas se encuadran en tres zonas diferentes: Sierra de San Pedro (SP), Monfragüe (MF) y Las Hurdes (LH). Los puntos de color negro representan las fincas con cerdo doméstico, mientras que los círculos de color gris representan las fincas sin cerdo doméstico.

La edad de cada uno de los animales incluidos en el estudio fue estimada mediante la observación de sus piezas dentarias. En las hembras se determinó su estado reproductivo mediante la observación de su aparato reproductor. Las hembras en las que se encontraron fetos, embriones o glándulas mamarias activas se clasificaron como hembras en fase de cría, mientras que las que no mostraron ninguna de estas características se clasificaron como hembras que no se encontraban en fase de cría. Además, en las hembras gestantes se determinó la “fertilidad potencial” contando el número de fetos o embriones que albergaban en su útero (Groot-

Bruinderink y cols., 1994). En los machos, ambos testículos fueron pesados determinando su peso medio.

La presencia de anticuerpos específicos frente a *Brucella* spp. fue determinada mediante la utilización de un kit ELISA comercial (INGEZIM BRUCELLA PORCINA, INGENASA, España). Además, se evaluó la presencia de infecciones genitales activas causadas por *B. suis* mediante el cultivo de hisopos asépticamente tomados en el aparato reproductivo de las hembras o los testículos de los machos. Las colonias sospechosas fueron identificadas como *B. suis* mediante un ensayo PCR específico (Romero y cols., 1995). El biovar al que pertenecían las cepas obtenidas se determinó mediante un kit PCR comercial. Además la variabilidad genética existente entre las cepas obtenidas se testó mediante MLVA (multiple-locus variant-repeat assay) (Le Flèche y cols., 2006; Al Dahouk y cols., 2007).

Para estudiar el efecto de la seropositividad frente a *Brucella* spp. sobre los parámetros reproductivos del jabalí planteamos diferentes modelos estadísticos. En estos, las variables reproductivas (estado reproductivo, fertilidad potencial y peso medio de testículos en los machos) fueron tratadas como variables respuesta (y), mientras que la seropositividad frente a *Brucella* spp., la densidad poblacional o la edad fueron propuestas como variables explicativas (x) (Tabla 1). Una vez planteados los modelos estadísticos con soporte biológico, realizamos una selección mediante el criterio teórico-informativo de Akaike (AIC) (Crawley, 2007).

Por otra parte, los factores de riesgo más influyentes en la probabilidad de presentar anticuerpos específicos anti-*Brucella*, se determinaron mediante la utilización de “tree models”. Este tipo de modelos permite visualizar qué variables explicativas (factores de riesgo) influye en mayor medida en la variable respuesta (presencia o ausencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp.). Los posibles factores de riesgo considerados fueron: sexo, edad, densidad poblacional, área geográfica y presencia o ausencia de cerdo doméstico.

De los 204 jabalíes serológicamente analizados, 121 animales resultaron seropositivos frente a *Brucella* spp., mientras que solamente 7 de los 188 animales en

los que se valoró la presencia de *Brucella* spp. en el tracto reproductivo fueron positivos. Todos los aislamientos fueron identificados como *B. suis* bv 2. Además, los resultados obtenidos en el MLVA revelaron que las cepas procedentes de las mismas áreas de estudio estaban genéticamente más relacionadas (Imagen 13).

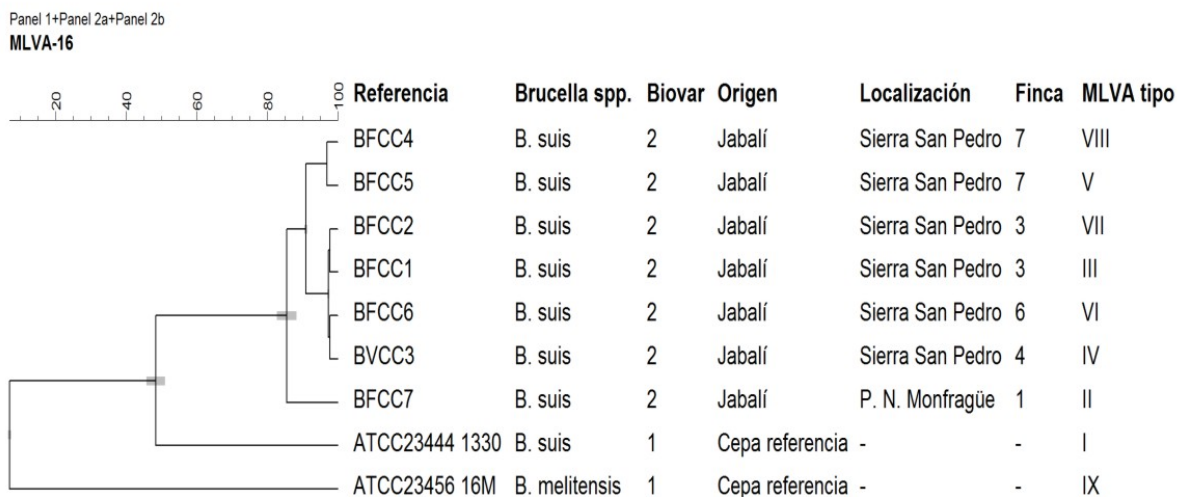


Imagen 13: Dendrograma en el que se observa la relación genética hallada entre las diferentes cepas de *Brucella suis* biovar 2 aisladas durante el estudio. En él se puede observar como las cepas pertenecientes a la misma zona están más relacionadas genéticamente.

El 66 % de las hembras estudiadas se encontraba en fase de cría, mostrando una fertilidad potencial media de 3.5 crías. De acuerdo con la selección de modelos mediante AIC, el estado reproductivo de las hembras está relacionado con la edad, siendo las hembras mayores las que tienen más probabilidades de estar en fase de cría (Tabla 1). Sin embargo, ninguna de las variables explicativas propuestas pudo explicar la fertilidad potencial encontrada. Finalmente, el tamaño medio de los testículos estuvo claramente influido por la edad de los individuos y por la estación en la que los animales fueron muestreados, siendo mayor en los animales de más edad y en los animales que fueron muestreados en otoño. La falta de efecto de la seropositividad frente a *B. suis* en el tamaño de los testículos contrasta con las orquitis bilaterales encontradas en 3 de los 4 machos que mostraron una infección genital activa por este microorganismo.

Tabla 1: Selección de los modelos planteados para explorar la influencia de *Brucella suis* biovar 2 (Bsbv2) en los parámetros reproductivos de 103 hembras y 85 machos de jabalí cazados en Extremadura. Para los parámetros reproductivos de las hembras (estado reproductivo y fertilidad potencial) se usaron modelos lineales generalizados (GLM) con una estructura de error concreta. En el caso del peso de los testículos se usaron modelos aditivos (GAM).

Modelo Biológico	K	AICc	Δ_i	w_i
Hembras				
<i>Estado Reproductivo</i>				
Edad	3	102.31	0	0.62
Edad + Bsbv2	1	104.14	1.83	0.25
Edad + Bsbv2 + Densidad Poblacional	3	105.47	3.16	0.13
<i>Fertilidad Potencial</i>				
Modelo nulo	1	124.30	0	0.51
Densidad Poblacional	2	126.17	1.87	0.19
Edad	2	126.38	2.08	0.19
Densidad Poblacional + Bsbv2	3	128.56	4.26	0.06
Edad + Bsbv2	3	128.76	4.46	0.05
Edad + Bsbv2 + Densidad Poblacional	4	131.01	6.71	0.01
Machos				
<i>Peso Testículos</i>				
Edad + Estación	6	854.79	0	0.48
Edad + Bsbv2	6	856.85	2.06	0.17
Edad + Estación + Bsbv2	7	857.57	2.78	0.12
Edad	5	857.74	2.95	0.11
Edad + Estación * Bsbv2	8	857.81	3.02	0.10

K: Número de parámetros incluidas las intersecciones. AICc: Criterio teórico-informativo de Akaike corregido para muestras pequeñas. Δ_i : Diferencia con respecto al AICc del mejor modelo. w_i : Peso de Akaike. Los mejores modelos se presenta en negrita.

A la hora de determinar los factores de riesgo que influyen en la presencia o no de anticuerpos frente a *Brucella* spp., se obtuvo un *tree model* final con tres variables que fueron: densidad de jabalíes en verano, edad y sexo. Este modelo explicó el 12.1 % de la probabilidad de que un individuo sea seropositivo a *Brucella* spp. (Imagen 14). Así, los animales con mayores probabilidades de ser seropositivos frente a *Brucella*

spp. fueron los procedentes de fincas con una densidad de animales mayor a 2.5 individuos por cada 100 hectáreas. Por el contrario, en fincas con menor densidad, fueron los animales mayores de 22 meses los que mostraron mayor probabilidad de presentar anticuerpos frente a esta bacteria. Después lo fueron las hembras menores de 22 meses y por último, los machos menores de esta edad.

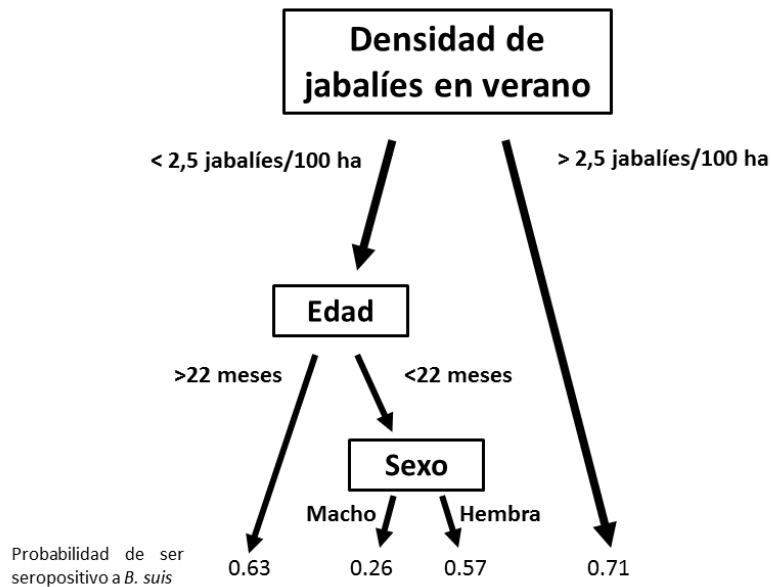


Imagen 14: "Tree model" obtenido al explorar los principales factores de riesgo que afectan a la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp.

Así, los resultados obtenidos demuestran que Extremadura es una de las regiones más seroprevalentes frente a *Brucella* spp. de España (Muñoz y cols., 2010). Sin embargo, estas altas prevalencias no se corresponden con un elevado número de infecciones genitales activas (Godfroid, 2002). La existencia de anticuerpos frente a un microorganismo no implica necesariamente la presencia de ese agente en el organismo. Este hecho se ha demostrado en infecciones experimentales realizadas con *Brucella* spp. en cerdo, en las que a los 4 meses post infección resultó imposible aislar este patógeno de los animales infectados (Deyoe, 1972). Además, no debemos olvidar que los valores obtenidos en las serología frente a *Brucella* spp. siempre podrían estar sobreestimados debido a las reacciones cruzadas que pueden existir con otras bacterias gram-negativas (Muñoz y cols., 2010).

El principal factor de riesgo asociado a la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. fue la densidad de jabalíes en verano. Probablemente, en esta época del año, el contacto entre animales en los escasos puntos de comida y agua es más frecuente en las fincas con densidades elevadas (Fernández-Llario, 1996). Además, esta relación ya ha sido sugerida en un trabajo realizado en Suiza en el que se observó que la seroprevalencia frente a *Brucella* spp. aumenta al incrementarse el número de jabalíes (Wu y cols., 2011). Sin embargo, en otros estudios realizados en nuestro país no se apreció una densodependencia de las seroprevalencias frente a *Brucella* spp., posiblemente, porque este trabajo estudió diferentes tipos de fincas de jabalíes, entre las que podrían estar incluidos fincas intensivas con una elevada densidad de jabalíes pero libres de *B. suis* (Muñoz y cols., 2010).

Los machos menores de 22 meses resultaron ser el grupo de animales con menos posibilidades de mostrar anticuerpos frente a *Brucella* spp. Considerando que la actividad sexual de un macho comienza a los dos años de edad aproximadamente, podemos decir que la importancia sexual de este grupo de animales es casi inexistente. Esto sugiere que la transmisión sexual de *B. suis* entre jabalíes podría ser una ruta de contagio importante, ya que los animales sexualmente activos son los que presentan una mayor probabilidad de ser seropositivos frente a este microorganismo. (Fernández-LLario, 2005).

Difiriendo con lo descrito en algunos de los trabajos más recientes, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la presencia de cerdo doméstico en las fincas estudiadas, no supone un factor de riesgo para la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. en el jabalí (Muñoz y cols., 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio sólo hemos valorado la presencia o ausencia de porcino doméstico, sin tener en cuenta su densidad, las probabilidades de contacto con el jabalí o su estatus serológico frente a *Brucella* spp. Por estos motivos, un estudio más exhaustivo sería necesario para entender completamente el papel que el cerdo doméstico puede tener en la dispersión de *B. suis* en los jabalíes de la zona estudiada.

La presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. no tuvo una gran influencia en los parámetros reproductivos medidos en el jabalí, que parecen estar más influidos por factores como la edad. Solamente, el estado reproductivo de las hembras se vio ligeramente afectado por la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp., siendo mayor el porcentaje de hembras en fase de cría entre las hembras seronegativas. Sin embargo, será necesario incluir un tamaño muestral mayor y valorar algún otro parámetro reproductivo como la mortalidad intrauterina, para determinar con mayor exactitud el efecto de *B. suis* en los parámetros reproductivos de las hembras. Por otra parte, no hay que olvidar que debido a la escasa presencia de hembras con infecciones genitales activas, estamos valorando el efecto de *B. suis* basándonos en la presencia de anticuerpos, obviando que en muchas ocasiones, los parámetros reproductivos vuelven a la normalidad un vez superada la infección por este microorganismo, aunque los anticuerpos sigan circulando (MacMillan y cols., 2006). Este hecho podría suponer una limitación a la hora de interpretar nuestros resultados.

Curiosamente las tres hembras en las que se detectó una infección genital activa frente a *B. suis* no se encontraban en fase de cría y tres de los cuatro machos infectados mostraron una orquitis bilateral bastante marcada. Lamentablemente, debido al escaso número de animales infectados el efecto de estas infecciones no pudo ser estadísticamente probado. Sin embargo, parece claro que, debido a la baja incidencia de infecciones genitales activas por *B. suis* y el escaso efecto que produce la presencia de anticuerpos en los parámetros reproductivos, *B. suis* no influye demasiado en el éxito reproductivo de las poblaciones de jabalíes.

Las altas seroprevalencias encontradas y el aislamiento de *B. suis* en el jabalí confirman que este patógeno se encuentra presente y circulando en las poblaciones de jabalí de Extremadura. Así, teniendo en cuenta que la transmisión sexual es una de las principales rutas de contagio de este microorganismo, y que por lo tanto, sobre todo los machos pueden dispersar la enfermedad a los rebaños de porcino doméstico que comparten hábitat, podemos decir que la presencia de *B. suis* supone un riesgo para el porcino doméstico. Nuestro modelo demuestra que la densidad de jabalíes es un factor de riesgo importante a la hora de cuantificar las seroprevalencias frente a

Brucella spp. en poblaciones de jabalíes, por lo que posiblemente se podrían utilizar medidas de control encaminadas a disminuir la densidad de estos animales con el objetivo de reducir las prevalencias en aquellas poblaciones que supongan un riesgo para el porcino doméstico.

ORIGINAL ARTICLE

High-Density Dependence But Low Impact on Selected Reproduction Parameters of *Brucella suis* Biovar 2 in Wild Boar Hunting Estates from South-Western Spain

D. Risco¹, A. García¹, E. Serrano^{2,3}, P. Fernandez-Llario¹, J. M. Benítez¹, R. Martínez¹, W. L. García¹ and J. Hermoso de Mendoza¹

¹ Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX), Cáceres, Spain

² Servei d' Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, Spain

³ Estadística i Investigació Operativa, Departament de Matemàtica, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

Keywords:

wild boar; *Brucella suis*; density; risk factor; reproductive performance

Correspondence:

D. R. Pérez. Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria-UEX, Avda. Universidad sn, E-10003, Cáceres, Spain.

Tel.: +34927257114;

Fax: +34927257110;

E-mail: riscope@unex.es

Received for publication February 6, 2012

doi:10.1111/tbed.12060

Summary

Porcine brucellosis is a disease caused by *Brucella suis*, which is characterized by reproductive disorders in pigs. The number of cases of swine brucellosis has risen in many European countries, likely because of the presence of a wild reservoir of *B. suis* in wild boar. This study aimed at evaluating factors that may influence the probability of infection with *Brucella* spp. in wild boar and at assessing the impact of a previous contact with *Brucella* spp. on reproductive parameters of wild boar. Two hundred and four wild boar living in Extremadura (south-western Spain) were studied. The presence of anti-*Brucella* antibodies was determined using an indirect ELISA, while the presence of living bacteria in genital organs was evaluated through microbiological cultures. Sex, age, density of wild boar in summer and presence of outdoor pigs were selected as possible risk factors for being seropositive for *Brucella* spp. in wild boar. In addition, reproductive parameters such as breeding status or potential fertility in females and testis weight in males were estimated and related to the presence of anti-*Brucella* antibodies. A total of 121 animals were seropositive, resulting in a prevalence of 59.3% (95% CI). In addition, seven isolates of *B. suis* biovar 2 were obtained. Wild boar density in summer, as well as age and sex, was proposed as factors to explain the probability of *Brucella* seroconversion, although wild boar density in summer was the key factor. Current measures of reproductive parameters were not influenced by a previous contact with *Brucella* spp. Isolation of *B. suis* confirms that wild boar could represent a risk to domestic pig health in the study area. Wild boar density seems to have a great influence in the probability of infections with *B. suis* and suggests that density management could be useful to control *Brucella* infection in wild boar.

Introduction

Porcine brucellosis is an infection of pigs caused by biovar (bv) 1, 2 or 3 of *Brucella suis* (*B. suis*) that results in infertility or abortion at any stage of gestation in females or in orchitis in male boars (MacMillan et al., 2006). This infection shows a worldwide distribution and rarely becomes

endemic but the occurring sporadic outbreaks can lead to serious (OIE, 2009) economic losses on intensive pig farms (Algers et al., 2009).

Although no cases of porcine brucellosis have ever been declared in most northern European countries (e.g. Norway, Finland, Sweden or the United Kingdom), the number of cases of infection in France, Denmark and Germany in

domestic pigs has shown a sharp increase since the 1990s (Godfroid and Kahlsbohrer, 2002). It has been suggested that transmission from wild reservoirs (especially wild boar and hares) could play an important role in explaining these differences in the occurrence of *B. suis* (Cvetnic et al., 2009). In fact, *B. suis* spillover from wild boar (*Sus scrofa*) to livestock has been reported several times (Godfroid et al., 1994; Andersen and Pedersen, 1995) and thus provides a link between the presence of wild boar and the latest outbreaks of swine brucellosis in Europe (Cvetnic et al., 2009).

However, despite the importance of wild boar as a reservoir of *B. suis* in the European Community, few efforts have ever been made to identify the principal environmental-, population- or human-related risk factors in *B. suis* infection in the wild boar. Currently, aside from a clear seasonal-, gender- and age-dependent prevalence of *B. suis* (Bergagna et al., 2009; Muñoz et al., 2010), the density of outdoor domestic pigs (measured at regional scale) is the sole extrinsic factor that has been linked to *B. suis* occurrence in wild boar (e.g. Spain, Muñoz et al., 2010). Surprisingly, to date, no work has detected density dependence of *B. suis* infection in wild boar, a risk factor typically linked to common pathogens of this species such as porcine circovirus type 2 (Vicente et al., 2004) or *Mycobacterium bovis* (Vicente et al., 2007). According to an extensive epidemiological study of brucellosis in Spanish wildlife (Muñoz et al., 2010), this apparent lack of density dependence warrants further research. Wild boar density can be influenced by management measures (e.g. the restriction of the use of supplementary feeding or an increase in hunting pressure), which may represent an excellent starting point for controlling porcine brucellosis. The pathogenicity of *B. suis* in wild boar has yet to be clarified (Godfroid, 2002), although the most recent research suggests that *B. suis* bv2 has little influence on reproductive parameters (ovulation rate, litter size or partial resorption index) in female wild boars (Ruiz-Fons et al., 2006). To date, no work has explored the effect of *B. suis* bv2 on male wild boars.

The main aim of this work was to evaluate whether or not the interaction between (i) host- (age, sex and population density), (ii) environmental- (geographical location) and (iii) human management-related risk factors (presence/absence of outdoor domestic pigs) influences the probability of *B. suis* bv2 infection in wild boars. Thus, we studied the influence of a previous contact with *Brucella* spp. on reproductive parameters in both female (breeding status and fertility) and male wild boars (weight of testes) and assessed the variability of the *B. suis* isolates that we obtained. Furthermore, this work represents the first fine-scale survey of porcine brucellosis in wild boar in Extremadura, a vast region in south-western Spain where rural economy is largely based on extensive pig farming.

Material and Methods

Study area

This study was carried out in Extremadura, a Mediterranean region in south-western Spain with mountains peaking at 685 m a.s.l. Average annual precipitation reaches 623 mm and is concentrated in the period November–April. The mean annual temperature averages 17.7°C, January being the coldest and July the warmest months of the year. The vegetation is characterized by abundant *Quercus ilex* and *Q. suber* forests with understoreys dominated by *Quercus coccifera*, *Cistus ladanifer* and *Erica arborea*.

Animals from eleven unfenced hunting estates with no artificial management practices in three different areas, *Sierra de San Pedro* (39°27'0"N–5°19'0"O), *Monfragüe* (39°50'27"N–6°01'48"O) and *Las Hurdes* (40°30'N–6°30'O, see Fig. 1), were sampled during the study period (2004–2005).

Wild boar density in the study area ranged from 2 to 10 individuals per square kilometre.

This population parameter was estimated in summer by counting the maximum number of boars per counting session (4 h previous to nightfall) observed in pre-determined open areas. In these places, boars are baited every week with



Fig. 1. Map showing the location of areas where wild boar was sampled for exploring the role of host, environmental and human management risk factors on the probability of *B. suis* bv 2 infection in the region of Extremadura, south-western Spain. (SP, Sierra de San Pedro; MF, Monfragüe; LH, Las Hurdes). Solid dots represent estates with domestic pig farms; circles represent estate without pig farms. Small map in the upper right corner represents the localization of the studied area within Spain.

corn and counted using binoculars from fixed points less than 300 metres away. These counts took place from July to September, a period in which food is scarce in these Mediterranean ecosystems. All counting points in each hunting estate were visited simultaneously to avoid double counts of boars. Therefore, both the number of fixed points and the number of counting sessions can be considered to be constant for each hunting estate.

Because domestic pigs are a reservoirs of *B. suis* in Spain (Muñoz et al., 2010), the presence of domestic pigs was recorded for each hunting estate. It is important to note that in these hunting estates, no physical barrier separates domestic pigs from wild boar, which share pastures, food and water points, thereby making the contact among these animals very likely. Outdoor pig farms were present in six of the eleven studied estates (Fig. 1).

Wild boar data

All the 204 wild boars studied were hunt harvested during the 2004–2005 hunting season between October 12 and February 28. Once an animal was shot, its sex was determined by direct observation of genitalia, and its age was estimated based on its tooth replacement and eruption patterns, and as well by dental attrition (Boitani and Mattei, 1992).

After sex and age determination, animals were dissected to extract their reproductive tracts, which were stored in plastic bags and maintained at 4°C in cool boxes and then examined within 20 h. Immediately afterwards, blood samples were collected from the heart or the thoracic cavity of the wild boar and kept at 4°C. Subsequently, blood samples were centrifuged a 3000 rpm for 10 minutes at the Animal Health Department of the University of Extremadura (Spain). Only sera of acceptable quality (sera perfectly separated from the coagulum and without any kind of residual) ($n = 204$) were selected for serology and stored at -20°C until further analysis.

In the laboratory, 188 reproductive organs were studied. After removal of the Vas deferens ($n = 85$), the testes were blotted dry with a paper towel and weighed to the nearest 0.01 grams. Any partially damaged organs were excluded from our study. To assign breeding status, the reproductive tracts of females ($n = 103$) were also analysed, with particular attention given to the ovaries and the presence of embryos or fetuses. Female breeding status (breeding or non-breeding) was assessed by detecting the presence of embryos, fetuses or extended teats. When none of these features were present, females were considered to be non-breeding. In pregnant females, the number of fetuses was counted to estimate potential fertility (Groot Bruinderink et al., 1994). The presence of gross lesions was evaluated in both female and male reproductive organs.

Serological and bacteriological study

Brucella spp. antibodies were detected using as per the manufacturer's instructions, a commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA), Ingezim Brucella Porcina (Ingenasa, Madrid, Spain), with 98.6% sensitivity and 100% specificity in domestic pigs. True prevalence at 95% CI of *B. suis* was estimated taking into account apparent prevalence (number of animals tested positive/number of animals tested) and both the sensitivity and specificity of the ELISA test (Rogan and Gladen, 1978).

Of the 204 wild boars studied, 188 were included in the bacteriological study (85 testicular and 103 vaginal swabs taken before performing the necropsies). Inoculations were carried out in a *Brucella* medium (OIE, 2009) enriched with 10% horse serum, incubated at 37°C for at least 10 days in an atmosphere containing 5% CO₂. Putative *Brucella*-positive cultures were further analysed using standard bacteriological procedures. DNA was extracted using a QIAamp DNA minikit (QIAGEN, Hamburg, Germany); isolates were identified as *Brucella* species using a previously described polymerase chain reaction technique (Romero et al., 1995). To assess the precise bv of the *B. suis* strains isolated, the INgene Bruce-ladder suis kit (Ingenasa, Madrid, Spain) was used as per the manufacturer's instructions. Finally, to assess the variability of wild boar *B. suis* isolates, a multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) based on a subset of 16 tandem repeat loci (MLVA-16) was performed following previously described procedures (Le Flèche et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). More information concerning this analysis can be found in the Data S1 (supporting information).

Statistical Procedures

A set of specific statistical models were evaluated to explore the effect of a previous contact with *B. suis* (as explanatory variable) on breeding status (categorical variable with two modalities: 1 = the sow was breeding and 0 = the sow was not breeding) and fertility (an ordinal variable ranging from one to six fetuses) of sows or testes weight of boars (a continuous variable). The effect of age (in months) was included as covariate in all statistical models due to its clear effect on the reproductive performance of female (Fonseca et al., 2011) and male (Rathje et al., 1995) wild boars. Boar density was also included as a covariate because competition for food causes density dependence in both birth and death rates of wild boar populations (Melis et al., 2006). Additionally, the season of harvesting and its interaction with *B. suis* infection were taken into account in the case of males (Mauget and Boissin, 1987).

Each response variable required different statistical modelling with specific error structures. For example, generalized linear models (GLM) were used for both breeding status (binomial errors and logit link function) and the potential fertility of females (Poisson errors and log link function), whereas additive models (Gaussian errors) were used for adjusting the testes weight in males.

In all cases, we followed an information-theoretic approach based on the Akaike information criterion corrected for small sample sizes (AICc) (Burnham and Anderson, 2003). We also estimated the Akaike weight (w_i), that is, the relative likelihood of the model given the data available. This statistical procedure was performed using the package 'mgcv', version 1.7-2 (Wood, 2011, for additive models) of the statistical software R.

We used a tree modelling approach to identify major risk factors linked to the presence of anti-*Brucella* antibodies. Classification and regression trees are flexible and robust analytical statistical tools that are ideally suited for the analysis of complex ecological (De 'Ath and Fabricius, 2000) and epidemiological data (Friedman and Meulman, 2003). In our case, *Brucella* seroconversion (i.e. a discrete nominal variable with two categories, 1 = when boar was *Brucella* seropositive and 0 = otherwise) was initially explained by the following risk factors: host factor as sex (male or female), age (in months) and wild boar density in summer (the winter wild boar density was also estimated but was excluded from our statistical analysis because it showed some degree of correlation with summer densities [$\beta = 0.5$, SE = 0.13, $P < 0.01$, $R^2 = 8\%$]); the environmental factor as geographical area (Monfragüe, Las Hurdes or Sierra de San Pedro) and human factor as the presence/absence of outdoor domestic pigs in each hunting state. Finally, the explained deviance for the final tree and predictions for specific values of the response variables were also generated. This statistical procedure was performed using the package 'tree' version 1.0–29 (Ripley, 2012, for fitting tree regression models) of the statistical software R version 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Results

Serology and bacteriology

The ELISA test was applied to 204 wild boars, of which 121 were found to be seropositive to *Brucella* (59.3%, 95% CI, 52.2–66.1). In the 188 culture attempts, a total of seven isolates were obtained (3.7%, 95% CI, 1.6–7.8). The seven culture positive animals (three females between 0.8 and 4 years old and four males between 1.5 and 5.5 years old) were also positive in the ELISA test.

All the isolates obtained were identified as *B. suis* bv 2 using the INgene Bruce-ladder suis kit. In addition, the

MLVA-16 assay revealed that six of the seven isolates from Sierra de San Pedro were closely related (i.e. more than 90.9% similarity). Further information concerning this analysis can be found in the Data S1 (supporting information).

Reproductive parameters

In terms of the breeding status of sows, 68 of the 103 (66%) females studied were breeding females. The mean number of foetuses in pregnant females was 3.5. Foetuses were counted in 35 of 68 pregnant females, with a minimum of two and a maximum of five.

The results of our model selection are shown in Table 1. According to our model selection procedure, the effect of age was sufficient ($w_{\text{Age}} = 0.62$, deviance explained = 25.7%) to explain the observed variability on the breeding

Table 1. Model selection for exploring the influence of *Brucella suis* biovar 2 (Bsbv2) on selected reproductive parameters of 103 female and 85 male wild boars hunt harvested in several hunting states in Extremadura, south-western Spain. For breeding status and potential fertility ($n = 36$), we used generalized linear models with specific error structures in each case, whereas for the effect on testis weight, additive models were used

Biological models	K	AICc	Δ_i	w_i
Female wild boar				
<i>Breeding status</i>				
Age	3	102.31	0	0.62
Age + Bsbv2	1	104.14	1.83	0.25
Age + Bsbv2 + Wild boar density in summer	3	105.47	3.16	0.13
<i>Potential fertility</i>				
Mo	1	124.30	0	0.51
Wild boar density in summer	2	126.17	1.87	0.19
Age	2	126.38	2.08	0.19
Wild boar density in summer + Bsbv2	3	128.56	4.26	0.06
Age + Bsbv2	3	128.76	4.46	0.05
Age + Bsbv2 + Wild boar density in summer	4	131.01	6.71	0.01
Male wild boar				
<i>Testis weight</i>				
Age + Season	6	854.79	0	0.48
Age + Bsbv2	6	856.85	2.06	0.17
Age + Season + Bsbv2	7	857.57	2.78	0.12
Age	5	857.74	2.95	0.11
Age + Season * Bsbv2	8	857.81	3.02	0.10

Age was in years, Season = autumn (October–December) and winter (January–February). K = number of parameters, including intercept; AICc = Akaike information criterion corrected for small sample sizes; ΔAICc = difference of AICc with respect to the best model; w_i = Akaike weight; Mo = null model only with the constant term. For breeding status and testis weight only models with ΔAICc less than 10 were shown. In bold, the best models.

status of sows. In fact, the probability of being pregnant increased with age ($\beta_{\text{Age}} = 1.18$, $\text{SE} = 0.27$), pregnant females being on average 1.5 years older (mean age of pregnant females = 2.8, min = 6 months max = 5.5 years) than their non-pregnant counterparts (mean age of pregnant females = 1.1 years, min. = 8 months, max. = 4 years). The competing model $w_{\text{Age} + \text{Bsbv2}} = 0.25$, deviance explained = 34.5% suggests that *B. suis* bv 2 contact diminishes the probability of becoming pregnant ($\beta_{\text{Bsbv2}} = -0.25$, $\text{SE} = 0.55$).

Our model selection suggested that none of the explanatory variables considered was able to explain the observed variability in apparent fertility ($w_{\text{Mo}} = 0.25$). However, wild boar density in summer did have a slight negative effect ($\beta_{\text{Wild boar density in summer}} = -0.08$, $\text{SE} = 0.13$), as suggested by the second competitive model. In fact, only 4% of the observed variability in the number of foetuses can be explained by density dependence during the dry season. Additionally, the three *B. suis* bv 2 culture positive females (i.e. actively infected animals) were in anoestrus without macroscopic lesions in their reproductive organs.

Testes weight clearly depended on age and season ($w_{\text{Age} + \text{Season}} = 0.48$), these two factors explaining 57.3% of variability in weight. Regardless of age, in autumn (October to December) boar testes weighed about 26 g more than in winter. However, despite the fact that the second candidate model included the effect of *B. suis* bv 2, this effect had little support ($\Delta i > 2$) for explaining the observed patterns. Therefore, these results can be regarded as spurious because *Brucella* prevalence in males was greater in autumn (68.9%, 59.85–78.02 at 95% CI) – when testes are heavier – than in winter (0.42%, 0.28–0.46 at 95% CI). Nevertheless, despite this apparent lack of effect, three-four *B. suis* bv 2 positive testes showed marked bilateral orchitis with the presence of adherences and purulent exudates in the scrotum (Fig. 2).

Risk factors for *B. suis* infection

The most parsimonious tree model was fitted using only three variables (wild boar density in summer, age and sex) and explains 12.1% of the probability of *Brucella* seroconversion (Fig. 3). Specifically and regardless of the age or sex of wild boar, the highest probabilities of seroconversion (0.71, Fig. 3) were found in hunting estates with wild boar densities in summer over 2.5 individuals per 100 ha. Conversely, when densities were below 2.5 boars/100 ha, the probability of *Brucella* contact depended mainly on the age and gender of pigs: males and females over 22 months old had the greatest probability of *B. suis* bv 2 contact ($P = 0.63$), followed by females under 22 months ($P = 0.57$), and finally by males under 22 months ($P = 0.26$), in which *Brucella* contact was occasional. Neither the presence of outdoor domestic pigs nor the



Fig. 2. Orchitis with presence of adherences and purulent exudates. Scrotum has been cut open allowing to see exudates and adherences.

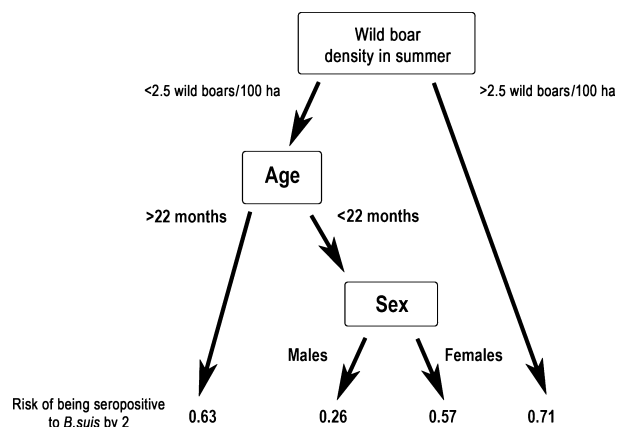


Fig. 3. Tree-based modelling representing the most important risk factors for explaining the probability of seroconversion against *B. suis* bv 2 in wild boar hunt harvested in hunting states in Extremadura, south-western Spain.

geographical location influenced seroconversion against *Brucella* spp.

Discussion

The prevalence of anti-*Brucella* antibodies observed in our study area is in line with that obtained in the most recent national survey (Muñoz et al., 2010) and reveals Extremadura to be one of the Spanish regions with the highest *Brucella* seroprevalence. However, despite the large number

of *Brucella* seropositive animals, only seven isolates were obtained, all identified as *B. suis* bv 2. It is important to note that the presence of specific antibodies against *Brucella* does not necessarily imply active infection (Godfroid, 2002). In domestic pigs experimentally infected with *B. suis*, pathogen isolation became impossible a mere 4 months after inoculation (Deyoe, 1972), an observation that may explain the small number of active genital infections relative to the amount of seropositive animals at the time of sampling. Moreover, we should take into account the fact that the existence of false-positive serological reactions induced by gram-negative bacteria sharing common epitopes with *Brucella* might cause an overestimation of the apparent seroprevalence against *Brucella* (Muñoz et al., 2010).

Wild boar density in summer was the most important factor for explaining *B. suis* bv 2 prevalence in our study area, probably because it is correlated with a higher contact rate of animal at specific points during the dry period when food and water is scarce (Fernández-Llario, 1996). In agreement with this finding, a recent study has reported a parallel increase of *Brucella* spp. prevalence and of the wild boar population size in Switzerland (Wu et al., 2011). However, surprisingly, other studies conducted in Spain (Muñoz et al., 2010) have failed to detect any kind of density dependence, possibly because *Brucella*-free intensive game exploitations with high wild boar densities were included. In our case, we only analysed data from unfenced estates with densities of 2–10 wild boars per square kilometre, while in other works a number of different types of populations (open, fenced and farmed) have been studied. In these kinds of populations other risk factors may be more relevant than wild boar density.

In addition, *B. suis* bv 2 infections seem to depend on age and sex, wild boar males under 22 months being the group with the lowest prevalence. Considering that sexual activity in male wild boars under 2 years old is limited (Fernández-Llario, 2005), our results suggest that transmission of *B. suis* mostly occurs through mating. It is in agreement with the results found in previous studies where the presence of anti-*Brucella* antibodies depended on sex and age of wild boar, being animals sexually active those with higher prevalence (Bergagna et al., 2009).

In contrast to recent studies from the same region (Muñoz et al., 2010), the existence of outdoor pig farms did not appear to have any type of influence on the observed risk of *B. suis* infection. However, we should be aware that our way of characterizing the effect of domestic pigs (i.e. presence or absence of outdoor exploitations) is a poor substitute for determining the risk of interactions with domestic pigs. More accurate estimates of outdoor pig densities sharing habitats with wild boar and the knowledge about their serology status against *Brucella* would allow us

to improve our understanding of the role of livestock in the maintenance and spread of *B. suis* bv 2.

According to our results, a previous contact with *B. suis* bv2 does not appear to have any influence on wild boar reproductive parameters, which were mainly shaped by the age of individuals. Only the breeding status of females seemed to be slightly affected by a previous contact with *Brucella* (which diminishes the probability of becoming pregnant), but further research considering additional measurements of fecundity (e.g. intrauterine mortality) is still needed to address this question. Indeed, we used seropositivity and not active genital infection with *B. suis* to evaluate the influence of *Brucella* on the studied reproductive parameters, and it has been reported that some time after *B. suis* infections in domestic pigs, reproductive parameters can revert to normal again (MacMillan et al., 2006).

Interestingly, three females with active infections turned out to be non-breeding females, whereas three of four infected males had manifest orchitis. However, due to the low number of infected animals found in this study, we cannot conclusively determine what effects active genital infection with *B. suis* had on these reproductive parameters, and further research with larger numbers of infected animals are needed to analyse this effect. Even so, the lack of influence on apparent fertility and the few cases of genital infections detected suggest that *B. suis* does not shape reproductive success in wild boar at population level, as has been suggested by other studies of wild boar populations with great seroprevalence against *Brucella* that have increased constantly (Wu et al., 2011).

The isolation of the oetiological agent of porcine brucellosis in our sample confirms that *B. suis* is present and circulates in the wild boar population in Extremadura. Adult, sexually active boars are potential spreaders of porcine brucellosis in outdoor pig farms that share the same habitat, above all in hunting estates with overpopulations of wild boar. Although our statistical modelling explained a moderately low proportion of the observed *B. suis* seroprevalence, our results suggest that wild boar density in summer may be a risk factor. Thus, management measures aiming at reducing wild boar densities may contribute to the control of porcine brucellosis. This measure will be extremely important in hunting estates with summer wild boar densities over 2.5 wild boar/100 ha and, particularly, in those estates that also have outdoor pig farms.

Acknowledgements

This work has been supported by the research projects PS0900513 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España), GRU10142 (Regional Government – Junta de Extremadura) and partially by PRI08A062 (Regional Government Junta de Extremadura and the European

Social Fund). D. Risco has a FPU grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2009-0704), and E. Serrano is supported by the Beatriu de Pinós programme (BP-DGR 2011) of the Catalan Science and Technology System, Spain. The authors would like to thank Dr Ignacio López-Goñi (Department of Microbiology, Universidad de Navarra) for providing the DNA from *Brucella* reference strains used in this study and to D. J. M. Cuesta for his assistance with the map design.

References

- Al Dahouk, S., P. L. Flèche, K. Nöckler, I. Jacques, M. Grayon, H. C. Scholz, H. Tomaso, G. Vergnaud and H. Neubauer, 2007: Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods* 69, 137–145.
- Algers, B., H. J. Blokhuis, A. Bøtner, D. M. Broom, P. Costa, M. Domingo, M. Greiner, J. Hartung, F. Koenen, C. Müller-Graf, R. Mohan, D. B. Morton, A. Osterhaus, D. U. Pfeiffer, R. Roberts, M. Sanaa, M. Salman, J. M. Sharp, P. Vannier and M. Wierup, 2009: Porcine brucellosis (*Brucella suis*) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA J.* 1144, 1–112.
- Andersen, F. M., and K. B. Pedersen, 1995: Brucellosis: a case of natural infection of a cow with *Brucella suis* biotype 2. *Dan. Vet.*, 78, 408.
- Bergagna, S., S. Zoppl, E. Ferroglio, M. Gobetto, A. Dondo, E. D. Glannatale, M. S. Gennero and C. Grattarola, 2009: Epidemiologic survey for *Brucella suis* biovar 2 in a wild boar (*Sus scrofa*) population in Northwest Italy. *J. Wildl. Dis.* 45, 1178–1181.
- Boitani, L., and L. Mattei, 1992: Aging wild boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. In: Spitz, F., G. Janeau, G. González, and S. Aulagnier (eds.), *Ongules/Ungulates* 91. pp. 419–421. SFPEM-IRGM, Toulouse.
- Burnham, K. P. and D. R. Anderson, 2003: Model selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. Springer-Verlag, New York.
- Cvetnic, Z., S. Spicic, J. Toncic, D. Majnaric, M. Benic, D. Albert, M. Thièbaud and B. Garin-Bastuji, 2009: *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *Rev. Sci. Tech.* 28, 1057–1067.
- De 'Ath, G., and K. E. Fabricius, 2000: Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for ecological data analysis. *Ecology*, 81, 3178–3192.
- Deyoe, B. L., 1972: Immunology and public health significance of swine brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160, 640–643.
- Fernández-Llario, P., 2005: The sexual function of wallowing in male wild boar (*Sus scrofa*). *J. Ethol.* 23, 9–14.
- Fernández-Llario, P., 1996: Ecología del Jabalí En Donaña: Parámetros Reproductivos e Impacto Ambiental. University of Extremadura, Cáceres.
- Fonseca, C., A. Alves da Silva, J. Alves, J. Vingada and A. Soares, 2011: Reproductive performance of wild boar females in Portugal. *Eur. J. Wildl. Res.* 57, 363–371.
- Friedman, J. H. and J. J. Meulman, 2003: Multiple additive regression trees with application in epidemiology. *Stat. Med.* 22, 1365–1381.
- Godfroid, J., 2002: Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 21, 277–286.
- Godfroid, J. and A. Kahlsbohrer, 2002: Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.* 90, 135–145.
- Godfroid, J., P. Michel, L. Uytterhaegen, C. De Smedt, F. Rasseigneur, F. Boelaert, C. Saegerman and X. Patigny, 1994: Endemic brucellosis due to *Brucella suis* biotype 2 in the wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *Ann. Med. Vet.* 138, 263–268.
- Groot Bruinderink, G. W. T. A., E. Hazebroek, and H. van der Voot, 1994: Diet and condition of wild boar, *Sus scrofa scrofa*, without supplementary feeding. *J. Zool. (Lond)*. 233, 631–648.
- Le Flèche, P., I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoed, K. Nöckler, H. Neubauer, L. A. Guilloteau, and G. Vergnaud, 2006: Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6, 9.
- MacMillan, A. P., H. Schleicher, J. Korslund, and W. Stoffregen, 2006: Brucellosis. In: Straw, B. E., J. J. Zimmerman, S. D'Alaia, and D. J. Taylor (eds.), *Diseases of Swine*. pp. 603–612. Iowa State Univ. Press, Ames.
- Mauget, R. and J. Boissin, 1987: Seasonal changes in testis weight and testosterone concentration in the european wild boar (*Sus scrofa L.*). *Anim. Reprod. Sci.* 13, 67–74.
- Melis, C., P. A. Szafrńska, B. Jędrzejewska and K. Bartoń, 2006: Biogeographical variation in the population density of wild boar (*Sus scrofa*) in western Eurasia. *J. Biogeogr.* 33, 803–811.
- Muñoz, P. M., M. Boadella, M. Arnal, M. J. de Miguel, M. Revilla, D. Martínez, J. Vicente, P. Acevedo, A. Oleaga, F. Ruiz-Fons, C. M. Marin, J. M. Prieto, J. de la Fuente, M. Barral, M. Barberan, D. F. de Luco, J. M. Blasco and C. Gortázar, 2010: Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infect. Dis.* 10, 46.
- OIE, 2009: Porcine Brucellosis. In: OIE (ed.), *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, pp. 835–844. OIE, Paris.
- Rathje, T. A., R. K. Johnson and D. D. Lunstra, 1995: Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. *J. Anim. Sci.* 73, 2177–2185.
- Ripley, B., 2012: Tree: Classification and Regression Trees. R package version 1.0-33. <http://CRAN.R-project.org/package=tree> (accessed 27 September 2012).
- Rogan, W. and B. Gladen, 1978: Estimating prevalence from results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
- Romero, C., C. Gamazo, M. Pardo and I. Lopez-Goni, 1995: Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 615–617.
- Ruiz-Fons, F., J. Vicente, D. Vidal, U. Höfle, D. Villanúa, C. Gauss, J. Segalés, S. Almería, V. Montoro and C. Gortázar, 2006: Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* 65, 731–743.

- Vicente, J., J. Segalés, U. Höfle, M. Balasch, J. Plana-Durán, M. Domingo and C. Gortázar, 2004: Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV 2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 35, 243–253.
- Vicente, J., U. Höfle, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Acevedo, R. Juste, M. Barral and C. Gortázar, 2007: Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet. Res.* 38, 451–464.
- Wood, S.N., 2011: Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J. R. Stat. Soc. (B)* 73, 3–36.
- Wu, N., C. Abril, V. Hinic, I. Brodard, B. Thür, J. Fattebert, D. Hüsey and M. P. Ryser-Degiorgis, 2011: Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in Switzerland? *J. Wildl. Dis.* 47, 868–879.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Variability of *B. suis* bv 2 isolates assessed by MLVA

3.2 Observaciones lesionales del Complejo Respiratorio Porcino en el jabalí. (*Pathological observations of Porcine Respiratory Disease Complex in the wild boar*).

El complejo respiratorio porcino (CRP) es una enfermedad multifactorial que produce importantes pérdidas económicas en la industria porcina (Maes y cols., 2000). Esta enfermedad afecta principalmente a cerdos en fase de cebo, con síntomas como tos, disnea, fiebre y un empeoramiento de sus índices de crecimiento (Opriessnig y cols., 2011). Los animales afectados presentan lesiones neumónicas que generalmente afectan a los lóbulos apicales y zonas ventrales del pulmón y microscópicamente se corresponden con una bronconeumonía, frecuentemente asociada a hiperplasia de los tejidos linfoides peribronquiales (BALT) (Harms y cols., 2002; Kim y cols., 2004).

El desarrollo del CRP depende de la interacción entre diferentes factores: microbiológicos (tipo de patógenos presentes), ambientales (sistema de manejo, estrés) o individuales (estatus inmunológico) (Opriessnig y cols., 2011). Dentro de los patógenos que producen el desarrollo de CRP en cerdo podemos encontrar dos tipos: primarios y secundarios. Los patógenos primarios son capaces de producir lesiones neumónicas por sí mismos, como resultado de su propia virulencia. Dentro de este grupo se incluyen virus, como el virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRSV), virus de la influenza porcina (SIV) o el circovirus porcino tipo 2 (PCV2); y bacterias como *Mycoplasma hyopneumoniae* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Por otra parte, los patógenos secundarios son agentes oportunistas que necesitan que el animal esté infectado con otro microorganismo para producir lesión. Dentro de estos patógenos se encuentran, entre otros *Pasteurella multocida* o *Haemophilus parasuis* (Brockmeier y cols., 2002).

La gran mayoría de los patógenos relacionados con el desarrollo de CRP en el cerdo han sido detectados también en el jabalí (Reiner y cols., 2009; Sibila y cols., 2010; Cuesta y cols., 2013). Sin embargo, las consecuencias lesionales que las infecciones por estos patógenos producen en este animal no han sido aún estudiadas. Así, los objetivos de este trabajo son valorar la presencia de los patógenos que

intervienen en el desarrollo del CRP en poblaciones de jabalí del suroeste de España y describir las lesiones neumónicas producidas por estos agentes en esta especie.

En este estudio se incluyeron un total de 210 jabalíes abatidos en monterías celebradas en 20 fincas del suroeste de España. Todos estos animales fueron inspeccionados *post-mortem*, determinando su edad y sexo. Durante la inspección se obtuvieron muestras de tejido pulmonar procedente de los lóbulos apicales que fueron fijadas en formaldehído para su estudio histológico. Una pieza adicional de tejido pulmonar fue congelada para su utilización en el estudio microbiológico. Además, se obtuvieron muestras de sangre de todos estos animales, las cuales fueron utilizadas para el diagnóstico serológico.

El diagnóstico de los diferentes patógenos respiratorios se llevó a cabo mediante ensayos PCR específicos para la detección de *M. hyopneumoniae* (Sibila y cols., 2010), *H. parasuis* (Oliveira y cols., 2001), *A. pleuropneumoniae* (Cho y cols., 2003), *P. multocida* (Townsend y cols., 1998a) y PCV2 (Cságola y cols., 2006). Para ello, previamente se extrajo ADN de las muestras de tejido pulmonar congeladas mediante un kit de extracción comercial. Por otra parte, la presencia de anticuerpos específicos frente a los virus ARN involucrados en el desarrollo del CRP, como PRRSV o SIV, se determinó mediante la utilización de kits ELISA comerciales (INGEZIM PRRS EUROPA y INGEZIM INFLUENZA PORCINA, INGENASA, España).

Paralelamente, se realizó un estudio lesional de los animales incluidos en este trabajo. Éste estuvo basado en la valoración histológica de cinco parámetros lesionales (infiltrado inflamatorio en tabiques alveolares, exudados inflamatorios en vías aéreas, hiperplasia del BALT, inflamación de lámina propia de bronquios y bronquiolos y necrosis de células epiteliales de bronquios y bronquiolos) que fueron valorados de 0 a 6 dependiendo de la gravedad encontrada (Imagen 15) (Landolt y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004). Además, con el objetivo de confirmar la presencia en pulmón de los patógenos detectados por serología, se realizaron diferentes ensayos inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* para detectar la presencia de PRRSV, PCV2 y SIV en un total de 26 muestras pulmonares. Finalmente, en estas mismas 26

muestras se realizó un ensayo de hibridación *in situ* para determinar la distribución de *M. hyopneumoniae* por el parénquima pulmonar.

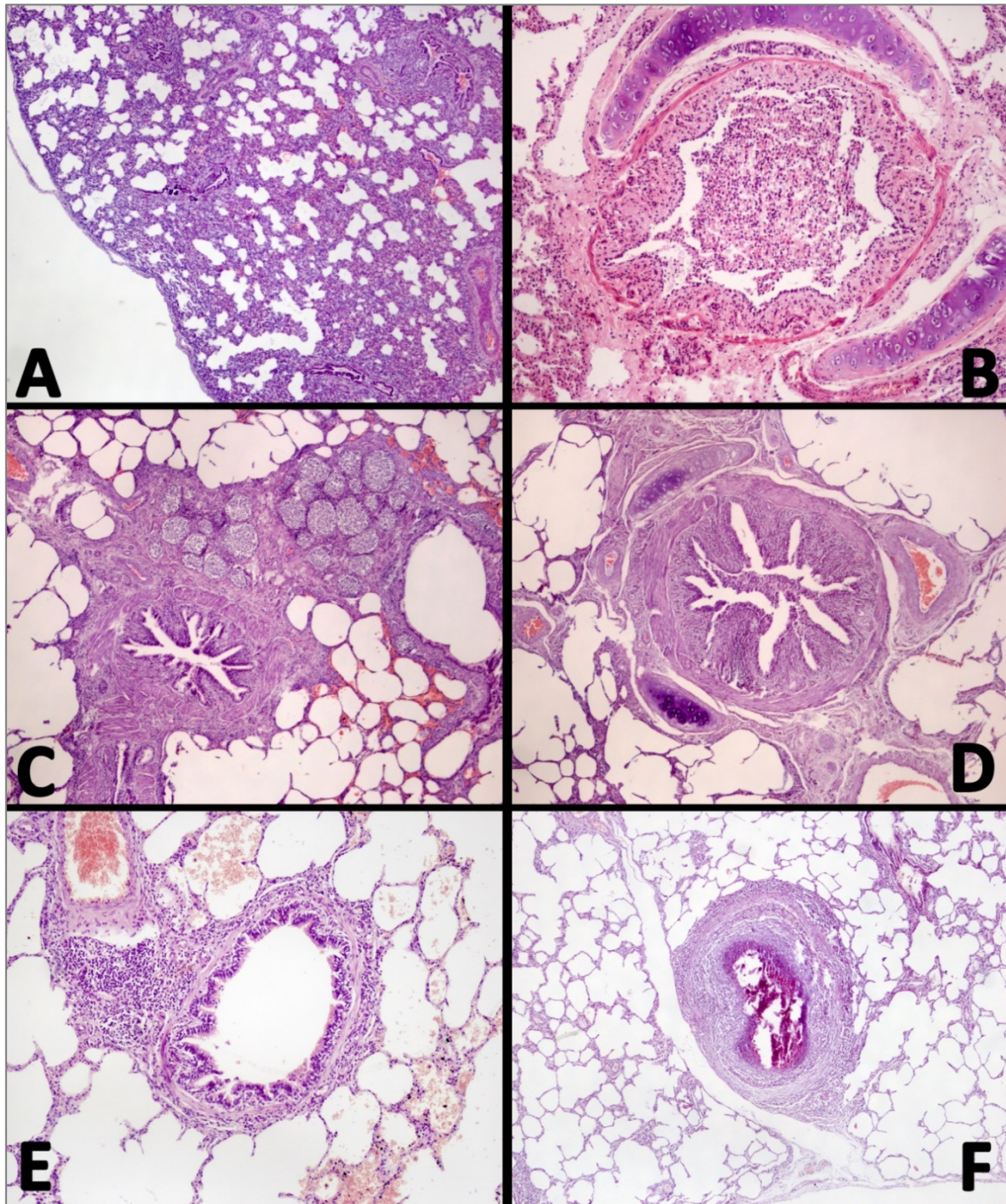


Imagen 15: Secciones histológicas de pulmones de jabalí teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE). A) Infiltrado inflamatorio en septos alveolares. 4x. B) Exudado inflamatorio en vías aéreas principalmente formado por macrófagos y neutrófilos. 20x. C) Hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquio. 10x. D) Inflamación de lámina propia de bronquio. 10x. E) Necrosis de células epiteliales de bronquiolo. 10x F) Lesión granulomatosa típica de tuberculosis. 4x.

Para determinar el efecto de los diferentes patógenos respiratorios en los parámetros lesionales valorados, se compararon las medias obtenidas para cada uno de ellos entre los animales infectados y no infectados con cada patógeno estudiado. Para esto, y debido a las características de los datos, se utilizó la prueba estadística U de Man-Whitney.

El porcentaje de animales con diagnóstico positivo a los diferentes patógenos valorados se resume en la Tabla 2. En muchos casos las prevalencias fueron diferentes entre los individuos de distintas clases de edad. Así las prevalencias frente a *H. parasuis* y *P. multocida* fueron mucho mayores en los animales más jóvenes.

Los animales incluidos en este estudio mostraron lesiones histológicas en general leves, con valoraciones medias menores que 2 en todos los casos. El parámetro lesional con mayor presencia fue la hiperplasia del BALT, encontrada en un 64.29 % de los jabalíes analizados, mientras que la presencia de necrosis en células epiteliales de bronquios y bronquiolos sólo fue detectada en un 2.38 % de los animales. Las lesiones histológicas también se vieron influidas por la edad ya que los animales más jóvenes mostraron una mayor cantidad de exudados en vía aéreas, mientras que los animales de mediana edad mostraron una hiperplasia del BALT más grave (Imagen 16).

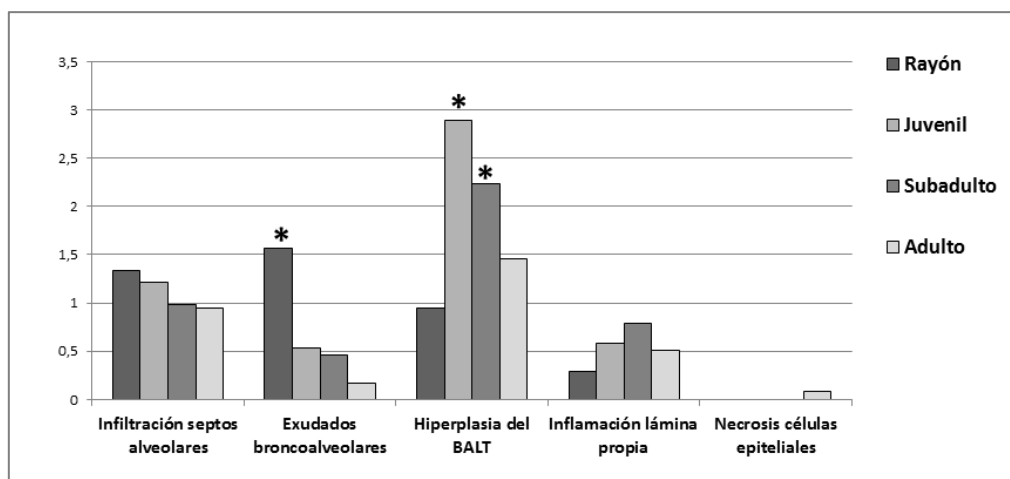


Imagen 16: Valores medios obtenidos en cada grupo de edad al llevar a cabo la valoración de los parámetros lesionales evaluados en este estudio. El asterisco indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos en distintos grupos de edad ($p < 0.05$).

Tabla 2: Porcentaje de animales positivos frente a los diferentes patógenos respiratorios incluidos en este estudio en jabalíes de diferentes edades: rayones (0-6 meses), juveniles (6-12 meses), subadultos (12-24 meses) y adultos (más de 24 meses).

Patógeno	Porcentaje de animales positivos	Resultados por edad
Virus		
Circovirus porcino tipo II	19.5 % (n=210)	Rayones: 14.3 % (n=18) Juveniles: 47.4 % (n=19) Subadultos: 31.3 % (n=48) Adultos: 12.5 % (n=112)
Virus influenza porcina	23.3 % (n=210)	Rayones: 14.3 % (n=21) Juveniles: 15.8 % (n=19) Subadultos: 12.5 % (n=48) Adultos: 33 % (n=112)
Virus del PRRS	0 % (n=72)	Rayones: 0 % (n=2) Juveniles: 0 % (n=7) Subadultos: 0 % (n=15) Adultos: 0 % (n=48)
Bacterias		
<i>Haemophilus parasuis</i>	3.8 % (n=210)	Rayones: 33.3 % (n=21) Juveniles: 0 % (n=19) Subadultos: 0 % (n=48) Adultos: 0.9 % (n=112)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	6.2 % (n=213)	Rayones: 4.8 % (n=21) Juveniles: 0 % (n=19) Subadultos: 6.3 % (n=48) Adultos: 5.4 % (n=112)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	24.8 % (n=210)	Rayones: 33.3 % (n=21) Juveniles: 36.8 % (n= 19) Subadultos: 27.1 % (n=48) Adultos: 21.4 (n=112)
<i>Pasteurella multocida</i>	1.4 % n=209	Rayones: 14.3 % (n=21) Juveniles: 0 % (n=19) Subadultos: 2.1 % (n=48) Adultos: 0 % (n=112)

Algunos de los parámetros lesionales estimados se vieron influidos por la presencia de determinados patógenos. Así, la cantidad de exudados alveolares fue mayor en los animales infectados por *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* y *H. parasuis*. Además, los animales infectados por este último patógeno mostraron un mayor grado de infiltrado inflamatorio en septos alveolares.

El estudio inmunohistoquímico reveló la presencia de PCV2, SIV y PRRSV en un 53.8 %, 19.23 % y 19.23 % de los animales estudiados respectivamente. Los antígenos de PCV2 fueron detectados principalmente en macrófagos localizados en el BALT. Por su parte las células inmunopositivas frente a SIV fueron escasas, tratándose principalmente de células epiteliales de bronquios y bronquiolos y algunos macrófagos alveolares. Los antígenos de PRRSV se observaron principalmente en macrófagos alveolares que, en ocasiones, formaban agrupaciones de células positivas. Por su parte, *M. hyopneumoniae* fue detectado principalmente adherido a la superficie de las células epiteliales de bronquios y bronquiolos. Por último, se encontraron bacilos ácido-alcohol resistente en los cuatro animales que presentaban granulomas tuberculosos en su parénquima pulmonar (Imagen 17).

Cinco de los 26 animales incluidos en el estudio inmunohistoquímico resultaron infectados por más de un patógeno. Generalmente, los animales que solamente estaban infectados por virus (infecciones simples o mixtas) o por *M. hyopneumoniae* mostraron lesiones histológicas leves. Sin embargo, aquellos con infecciones mixtas por *M. hyopneumoniae* y uno o más virus mostraron una bronconeumonía grave, asociada con neumonía intersticial y presencia de exudados alveolares.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los jabalíes de la zona estudiada son susceptibles a padecer infecciones por los patógenos más relevantes que intervienen en el desarrollo del CRP. Los animales estudiados mostraron lesiones neumónicas, en general leves, pero ampliamente distribuidas entre la población. La presencia y la gravedad de estas lesiones fue mayor en los animales infectados por *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* y *H. parasuis*.

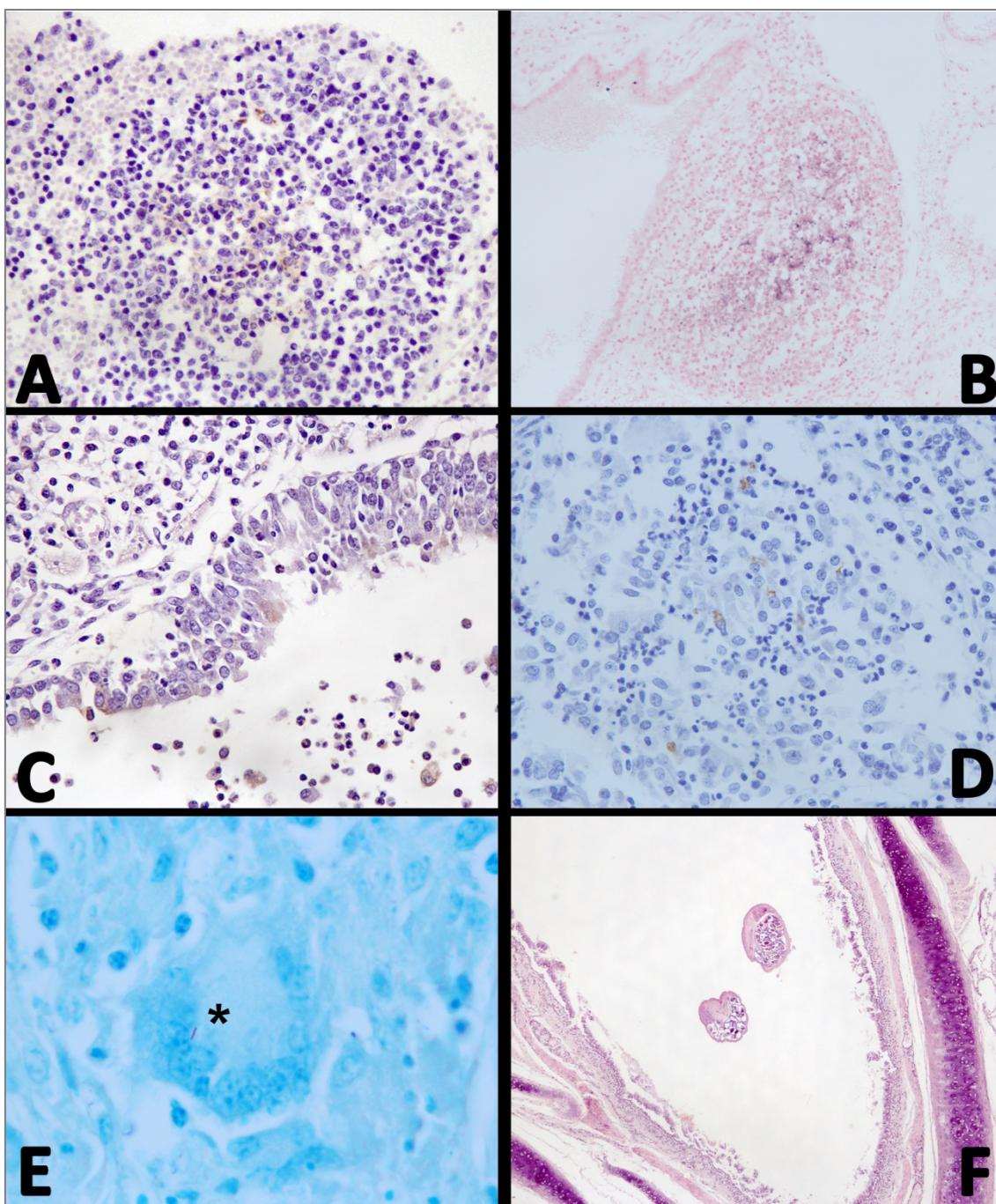


Imagen 17: Secciones histológicas de pulmón de jabalí. A) Numerosos macrófagos en tejido linfoide asociado a bronquio positivos al ensayo inmunohistoquímico para la detección de PCV2. Complejo Avidina Biotina (ABC)/ Hematoxilina de Mayer. 40x. B) Macrófagos marcados positivamente con la técnica de hibridación *in situ* para detección de PCV2. 10 x. C) Células epiteliales y macrófagos marcados positivamente con la inmunohistoquímica realizada para detección de SIV. ABC/ Hematoxilina de Mayer. 40x. D) Agrupación de macrófagos inmunopositivos frente a PRRSV. ABC/ Hematoxilina de Mayer. 40x. E) Bacilo ácido-alcohol resistente dentro del citoplasma de una célula gigante multinucleada en una lesión granulomatosa típica de tuberculosis (asterisco). Tinción Zielh-Neelsen. 40x F) Nematodos pulmonares en el interior de un bronquio. HE. 10x.

Las infecciones pulmonares con *M. hyopneumoniae* en jabalí habían sido anteriormente relacionadas con presencia de lesiones neumónicas macroscópicas; sin embargo no se había confirmado qué repercusiones histológicas producía este microorganismo (Sibila y cols., 2010; Chiari y cols., 2013). Por otra parte, las lesiones asociadas a *H. parasuis* en este estudio son similares a las descritas recientemente por Cuesta y cols., 2013. Los resultados obtenidos sugieren que, este patógeno, al igual que *P. multocida*, podría tener consecuencias sobre todo en los animales más jóvenes que son los que más frecuentemente se encuentran infectados por estos agentes.

La presencia de anticuerpos frente a los diferentes virus valorados en este estudio no influyó en la presentación de lesiones histológicas. Esto podría deberse a que la presencia de anticuerpos frente a estos microorganismos sugiere un contacto con ellos, pero no necesariamente que haya existido una infección pulmonar (Watanabe y cols., 2012).

Para poder dilucidar esta limitación se realizaron los ensayos inmunohistoquímicos. En el caso de SIV, se demostró como solo un porcentaje de los animales seropositivos frente a este virus, presentaban antígeno viral en sus pulmones. En el caso de PRRSV, pese a que ninguno de los jabalíes estudiados presentó anticuerpos frente a este virus, se detectaron células inmunomarcadas en un 19.23 % de los animales incluidos en el análisis inmunohistoquímico. El diagnóstico serológico estuvo basado en el empleo de un ELISA indirecto, cuya utilidad para el diagnóstico de PRRSV es limitada, ya que sólo detecta animales positivos que se encuentren entre los 10 y 300 días post infección (Venteo y cols., 2012). Así, podemos decir que el empleo de técnicas inmunohistoquímicas en combinación con técnicas serológicas podría ser una buena opción para obtener unos resultados más fiables en los sondeos epidemiológicos referentes a la situación de este patógeno en el jabalí.

Algunos de los pulmones analizados mostraron coinfecciones con más de un patógeno respiratorio. Las coinfecciones con este tipo de agentes pueden dar lugar a lesiones neumónicas más graves (Opriessnig y cols., 2011). Así, por ejemplo, la interacción entre *M. hyopneumoniae* y los virus respiratorios ha sido descrita en

múltiples ocasiones (Thacker, 2001; Brockmeier y cols., 2002; Harms y cols., 2002; Kim y cols., 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo parecen apoyar esta teoría, ya que los animales coinfectados con *M. hyopneumoniae* y algunos virus son los que muestran lesiones más graves.

Además, aparte de los patógenos que generalmente intervienen en el desarrollo del CRP, durante el transcurso del trabajo se hallaron otros agentes como *Metastrongylus* spp. o *Mycobacterium* spp., que pueden jugar un papel importante en la patología respiratoria del jabalí.

Más allá de la presencia de diferentes combinaciones de patógenos respiratorios, otros factores de tipo ambiental o individual podrían modular la gravedad de las lesiones encontradas en los casos de CRP en el jabalí (Opriessnig y cols., 2011). Así, los resultados obtenidos demuestran cómo las lesiones encontradas están influidas por la edad de los animales estudiados. Además, la gravedad de los casos de CRP se podría ver aumentada en las explotaciones que practican un manejo más intensivo de estos animales, ya que en este tipo de explotaciones son frecuentes factores como el estrés o el hacinamiento.

Por lo tanto, será necesario realizar más estudios en los que se tengan en cuenta este tipo de factores para poder comprender perfectamente las repercusiones del CRP en el jabalí.

Veterinary Pathology

Pathological Observations of Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) in the wild boar (*Sus scrofa*)

Journal:	<i>Veterinary Pathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Length Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Risco, David; Universidad de Extremadura, Sanidad Animal Cuesta, Jesus Maria; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Fernandez-Llario, Pedro; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Salguero, Javier; School of Veterinary Medicine, Surrey University, Pathology Gonçalves, Pilar; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal García-Jiménez, Waldo; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Martinez, Remigio; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Velarde, Roser; Universitat Autònoma de Barcelona, SEFAS Hermoso de Mendoza, Miguel; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Gómez, Luis; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal Hermoso de Mendoza, Javier; Facultad de Veterinaria, Sanidad Animal
Keywords:	Wildlife < Marine, Wildlife, and Zoo Animals < Species, Respiratory < Tissue, Infectious < Disease Process
Abstract:	<p>Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) is a respiratory syndrome related with different infectious pathogens. Although most of them have been detected in the wild boar, the lesional outcomes that PRDC pathogens produce in this species have not been described. The aims of this work were to assess the presence of the main swine respiratory pathogens in the wild boar from south-western Spain and to describe the pathological features of the lung from naturally infected animals with PRDC pathogens. A pathological assessment based on five histological parameters was carried out in lung sections from 210 hunted wild boar. The presence of lung infections with <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>, <i>Haemophilus parasuis</i>, <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, and <i>Pasteurella multocida</i> and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) were assessed by the use of specific PCR assays. Additionally, ELISA tests allowed to detect antibodies against Swine Influenza virus (SIV) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). Furthermore, the presence of infected cells with PCV2, SIV, PRRSV and <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> was evaluated in a significant number of lung sections using immunohistochemistry and in situ hybridization assays.</p> <p>Wild boar infected with <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>, <i>Haemophilus parasuis</i> or <i>Pasteurella multocida</i> showed statistically significant more severe lung lesions than non-infected animals. Infected cells with <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>, SIV, PCV2 and PRRSV were detected in single or mixed</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	infections. Animals that showed mixed infections with Mycoplasma hyopneumoniae and different viruses showed severe bronchopneumonia associated with interstitial pneumonia, suggesting that the interaction between pathogens enhance their pathogenic potential.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

1
2
3 **Pathological Observations of Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) in the**
4
5 **wild boar (*Sus scrofa*)**
6
7
8
9

10
11 D. Risco, J. M. Cuesta, P. Fernández-Llario, J. Salguero, P. Gonçalves, W. L. García-
12
13 Jiménez, R. Martínez, R. Velarde, M. Hermoso de Mendoza, L. Gómez, J. Hermoso de
14
15 Mendoza
16

17
18
19
20
21 Red de Grupos de Investigación en Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria,
22
23 Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain (DR, JMC, PF-LL, PG, WLG-J, RM, MH,
24
25 LG, JH).
26

27
28 Faculty of Health & Medical Sciences School of Veterinary Medicine, Surrey
29
30 University, Guildford, UK (FS).
31

32
33 Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia
34
35 Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain (RV).
36
37
38
39

40
41 Corresponding author: David Risco, Facultad de Veterinaria de Cáceres, Avenida de la
42
43 Universidad s/n, CP 10003, Cáceres, Spain. Phone number: +34927257114. FAX=
44
45 +34927257110, e-mail:driscope@gmail.com.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Summary

Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) is a respiratory syndrome related with different infectious pathogens. Although most of them have been detected in the wild boar, the lesional outcomes that PRDC pathogens produce in this species have not been described. The aims of this work were to assess the presence of the main swine respiratory pathogens in the wild boar from south-western Spain and to describe the pathological features of the lung from naturally infected animals with PRDC pathogens.

A pathological assessment based on five histological parameters was carried out in lung sections from 210 hunted wild boar. The presence of lung infections with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and *Pasteurella multocida* and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) were assessed by the use of specific PCR assays. Additionally, ELISA tests allowed to detect antibodies against Swine Influenza virus (SIV) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). Furthermore, the presence of infected cells with PCV2, SIV, PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* was evaluated in a significant number of lung sections using immunohistochemistry and *in situ* hybridization assays.

Wild boar infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* or *Pasteurella multocida* showed statistically significant more severe lung lesions than non-infected animals. Infected cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*, SIV, PCV2 and PRRSV were detected in single or mixed infections. Animals that showed mixed infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and different viruses showed severe bronchopneumonia associated with interstitial pneumonia, suggesting that the interaction between pathogens enhance their pathogenic potential.

Key Words: Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC), Wild Boar, lung lesions, Respiratory Pathogens.

1
2
3
4
5
6 Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) is a multifactorial respiratory syndrome
7 that produces important economic losses in porcine production throughout the world.²³

8
9
10 This syndrome mainly affects finishing pigs with a morbidity rate ranging from 10% to
11
12 40% and a mortality rate ranging from 2% to 10%.^{18,19,40}

13
14
15 Animals affected by PRDC usually show cough, dyspnea, fever, decreased feed intakes
16
17 and growth retardation.²⁷ Pulmonary lesions in affected animals are mainly located in
18
19 the cranioventral parts of the lung, where consolidation, discoloration and atelectasia
20
21 may be observed; although these features can vary depending on the pathogens
22
23 involved.¹⁸ Microscopically, these pulmonary lesions are represented by
24
25 bronchopneumonia with the presence of airways and alveolar exudates, peribronchitis
26
27 and peribronchiolitis and lymphoid hyperplasia; sometimes in combination with the
28
29 presence of inflammatory infiltration in alveolar septa and hypertrophy of type II
30
31 pneumocytes.^{18,19} The severity of PRDC manifestation in pigs depends on the
32
33 interactions between the respiratory pathogens involved, environmental factors such as
34
35 different management systems, and individual factors such as age or immunological
36
37 status.²⁷

38
39
40
41
42 Different infectious pathogens may be involved in the development of PRDC.
43
44 Respiratory pathogens are commonly divided into primary pathogens, that are able to
45
46 induce severe lesions in respiratory tissues as a result of their own virulence; and
47
48 secondary or opportunistic pathogens that usually induce lesions in the respiratory tract
49
50 in combination with other pathogens or factors.²⁷ The main primary respiratory
51
52 pathogens involved in PRDC are viruses such as porcine reproductive and respiratory
53
54 syndrome virus (PRRSV), swine Influenza virus (SIV), and porcine circovirus type 2
55
56 (PCV2); or bacteria such as *Mycoplasma hyopneumoniae* or *Actinobacillus*
57
58
59
60

1
2
3 *pleuropneumoniae*.³ On the other hand, within the most common opportunistic
4
5 respiratory pathogens we can find bacteria such as *Pasteurella multocida* or
6
7 *Haemophilus parasuis*.³
8
9

10 The majority of the pathogens usually involved in the development of PRDC in
11
12 domestic pigs, like PRRSV,³² SIV,⁶ PCV2,⁷ *M. hyopneumoniae*,³⁹ *A.*
13
14 *pleuropneumoniae*,³¹ *P. multocida*³³ or *H. parasuis*⁸ have been detected also in wild
15
16 boar (*Sus scrofa*). Wild boar can be affected by pathogens frequently found in domestic
17
18 pigs. Our research group has studied recently the involvement of some of these
19
20 pathogens in the respiratory pathology in wild boar, including *Erysipelothrix*
21
22 *rhusiopathiae*³⁶ or *Staphylococcus hyicus*³⁵. However the pathological outcomes
23
24 produced by the pathogens involved in PRDC in wild boar are unknown yet.
25
26
27

28 The aims of this work were to assess the presence of the main swine respiratory
29
30 pathogens in wild boar from south-western Spain and to describe the pathological
31
32 features of the lungs of naturally infected animals with PRDC pathogens.
33
34

35 **Material and Methods**

36 *Sampling area and animals*

37
38 This study was carried out on a total of 210 hunted wild boar from 20 game estates in
39
40 south-western Spain (Figure 1). The area of study has particular features in terms of
41
42 ecology and climate. Briefly, the average annual precipitation reaches 623 mm and is
43
44 concentrated in the months of November to April. The mean annual temperature
45
46 averages 17.7°C, being January the coldest and July the warmest month of the year. The
47
48 vegetation is typical of Mediterranean forest, characterized by abundant *Quercus ilex*
49
50 and *Q. suber* trees with understoreys dominated by *Quercus coccifera*, *Cistus ladanifer*
51
52 and *Erica arborea*. In all the game estates included in this work, wild boar share habitat
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 with red deer (*Cervus elaphus*) and in some cases with fallow deer (*Dama dama*), roe
4 deer (*Capreolus capreolus*) or extensive herds of cattle.

7 Wild boar included in this work were hunted between October 2011 and February 2013.

10 The sex and age of these animals were determined on the basis of the observation of
11 their sexual organs and the dentition eruption pattern respectively.¹ Animals were
12 divided in four different groups according to their ages: piglets (less than six months),
13 juveniles (six months-one year), yearlings (one year-two years) and adults (more than
14 two years) as described before.¹³

21 Necropsy examination of all animals was performed in the field with a detailed
22 macroscopic inspection of the lungs. Immediately after the examination of the lungs, a
23 piece from the cranial right lobe was taken and immersed in formalin. An additional
24 piece from the same lobe was collected in sterile storage bags, kept cold for transport
25 and, in less than six hours, frozen at -20°C until their utilization. Finally, blood samples
26 were collected from the heart or the thoracic cavity. These samples were centrifuged in
27 the laboratory at 3000 rpm for 10 minutes in order to separate the sera before being
28 stored at -20°C.

39 *Respiratory Pathogen Detection and Serology*

42 A set of specific PCR techniques was used to detect the presence of some of the most
43 common respiratory pathogens in wild boar lungs as has been described in similar
44 surveys.^{31,32,39} The DNA from pieces of the cranial lung lobe stored at -20°C was
45 extracted using a commercial QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen Ltd., Crawley, West
46 Sussex, RH10 9NQ, United Kingdom) following the manufacturer's recommendations.
47 Afterwards, specific PCRs for *M. hyopneumoniae*,³⁹ *H. parasuis*,²⁵ *A.*
48 *pleuropneumoniae*,¹⁰ *P. multocida*⁴¹ and PCV2,⁷ were carried out using previously
49 extracted DNA as template.

1
2
3 Since RNA molecules are easily degradable and this fact might impair the results
4
5 obtained in RT-PCR assays, specific commercial indirect ELISA kits were used to study
6
7 the contact with the most common RNA viral pathogens involved in PRDC. The
8
9 presence of antibodies against SIV (INGEZIM INFLUENZA PORCINA®) and PRRSV
10
11 (INGEZIM PRRS EUROPA®) was tested using the sera obtained from blood samples
12
13 following the manufacturers' recommendations.
14
15

16 17 *Pathological Study*

18
19 All the animals studied in this work were hunted wild boar. Animals showed frequent
20
21 artifactual pulmonary hemorrhages that could lead to misinterpretation in a gross
22
23 lesional scoring of these lungs. To avoid this fact, the pathological study was based only
24
25 on the study of general histopathological parameters previously described (Opriessnig *et*
26
27 *al.*, 2004), easily distinguishable from the artifacts caused by the type of death (shot).
28
29

30
31 Lung tissue samples previously immersed in buffered formalin were processed
32
33 following standard procedures and were routinely stained with hematoxylin and eosin
34
35 for the histopathological study. Lung sections were subjected to blind examination
36
37 (without knowing the microbiological study results) and were scored on a scale of 0 to 6
38
39 (0, normal; 1, mild multifocal; 2, mild diffuse; 3, moderate multifocal; 4, moderate
40
41 diffuse; 5, severe multifocal; 6, severe diffuse) for five histopathological parameters.
42
43 These parameters were: presence of alveolar septal infiltration with inflammatory cells
44
45 (Figure 2), peribronchial lymphoid hyperplasia (Figure 3), amount of exudates in alveoli
46
47 and airways (Figure 4), amount of inflammation in the lamina propria of bronchi and
48
49 bronchioles (Figure 5) and presence of necrosis in epithelial cells of bronchi and
50
51 bronchioles (Figure 6).^{21,28} The presence of tuberculosis-like (TB-like) granulomatous
52
53 lesions (Figure 7) and lung nematodes was also assessed in the lung sections studied.
54
55
56
57

58
59 *Immunohistochemistry (IHC), in situ hybridisation (ISH) and special stains*
60

1
2
3 In order to detect the presence of viral antigens and assess their distribution throughout
4 the pulmonary parenchyma, IHC and ISH techniques were used to detect SIV, PCV2
5 and PRRSV in 26 lung samples. These lungs were selected after the serological study
6 and the histopathological examination and included animals that were seropositive
7 against the viruses tested and showed no artifacts originated from the type of death.
8
9

10
11
12
13
14 The avidin–biotin-peroxidase technique was used with the corresponding specific
15 antibodies to detect PCV2, PRRSV and SIV following previously published
16 procedures.^{4,11,14} In addition, ISH technique to detect presence of PCV2 was carried out
17 as previously described.³⁷
18
19
20
21
22

23
24 To assess the distribution of *M. hyopneumoniae* in infected lung tissues, a fluorescent
25 ISH assay was carried out in these selected lungs following procedures previously
26 described². Finally, sections from these 26 lungs were also stained with a Ziehl-Neelsen
27 stain in order to confirm the presence of mycobacteria bacilli in TB-like granulomatous
28 lesions.
29
30
31
32
33

34 35 *Statistical Analyses*

36
37
38 Mean scores obtained for each of the studied histopathological parameters were
39 compared between animals infected and non-infected with each pathogen. Due to the
40 data features, a non-parametric test (Mann–Whitney U-test) was used to compare means
41 scored between groups. In addition, mean scores obtained for each histological
42 parameter were compared between age groups using Kruskal-Wallis test. All
43 calculations were performed using the SPSS 15 software package (SPSS Inc., Chicago,
44 Illinois, 60606, USA).
45
46
47
48
49
50
51
52

53 54 **Results**

55 56 57 *Pathogen assessment results*

58
59
60

1
2
3 The prevalences obtained to respiratory pathogens studied in different groups of age are
4 summarized in Table 1. Briefly, a moderate percentage of animals were infected by *M.*
5 *hyopneumoniae* (24.80%), PCV2 (19.5%), and showed antibodies against SIV
6 (23.30%), whereas the rest of microorganisms studied were only found in a small
7 percentage of animals. No PRRSV seropositive wild boar were found within studied
8 animals.
9

10
11
12 Prevalence was highly different between age groups in some cases. Thus, for example,
13 prevalence obtained to *H. parasuis* and *P. multocida* was significantly higher in piglets
14 (p=0.00) whereas the number of animals seropositive against SIV was higher in adult
15 animals (p=0.011).
16

17 *Histopathology*

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Histological lung lesions were found in 83.34% of the studied animals. Each
histopathological parameter studied was found in a different percentage of animals and
showed different severity. Whereas the presence of peribronchial lymphoid hyperplasia
was observed in 64.29% of the animals with a mean score of 1.75, the presence of
necrosis in epithelial cells of bronchi and bronchioles was only detected in 2.38% of the
animals. Infiltration within the alveolar septa with inflammatory cells, inflammation in
the lamina propria of bronchi and the presence of exudates within the airways and
alveoli were detected in 27.14%, 15.21% and 22.38% of the animals respectively,
showing mean scores of 1.02, 0.43 and 0.55. Tuberculosis-like granulomatous lesions
were detected in 42 animals, whereas lung nematodes were observed in 17 animals.

Histopathological lesions observed were influenced by the age of the animals (Figure
8). Thus, whereas piglets showed a significant higher score in the amount of exudates in
airways and alveoli (p=0.00), juveniles and yearlings presented a higher score of
peribronchial lymphoid hyperplasia (p=0.01).

Relationship between respiratory pathogens and histological lesions.

The mean score obtained for each histopathological parameter assessed in both, animals infected and non-infected with each pathogen, are summarized in table 2. Briefly, the presence of antibodies against SIV or PRRSV was not correlated to the presence of more severe histopathological lesions. However, some of the lesional parameters assessed were more severe in animals infected with *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* or *H. parasuis*. A higher amount of airways and alveolar exudates predominantly composed of macrophages and neutrophils was observed in animals infected by *M. hyopneumoniae* (U Mann-Whitney=34.18, p=0.004), *P. multocida* (U Mann-Whitney=145, p=0.011) and *H. parasuis* (U Mann-Whitney=256.5, p=0.000). In addition, a significant higher infiltration of inflammatory cells in alveolar septa was detected in animals infected by *H. parasuis* (U Mann-Whitney=426.5, p=0.013). Furthermore, lung sections in which lung nematodes were detected, had a significant higher amount of alveoli and airways exudates (U Mann-Whitney=884.5, p=0.018), lymphoid hyperplasia (U Mann-Whitney=712.5, p=0.016) and marked inflammation in the lamina propria of bronchi and bronchioles (U Mann-Whitney=327, p=0.000).

Immunohistochemistry and in situ hybridization

The presence of PCV2, SIV and PRRSV was detected in 14 (53.8%), 5 (19.23%) and 5 (19.23%) out of the studied animals, respectively. PCV2 was mainly detected in macrophages located in bronchus associated lymphoid tissues (BALT), although some alveolar macrophages also showed presence of PCV2 antigens (Figure 9). PCV2 infected cells were also detected using ISH assay in eight out of 14 animals that resulted positive for IHC methods showing a similar distribution (Figure 10). Immunopositive cells against SIV antigens were very low in positive animals and only some epithelial cells of bronchi and bronchioles and scarce alveolar macrophages showed a positive

1
2
3 stain against this microorganism (Figure 11). The presence of PRRSV antigen was
4
5 observed in alveolar macrophages, occasionally forming clusters of positive cells and,
6
7 also, in very few epithelial cells of bronchi and bronchioles occasionally sloughing into
8
9 the airway lumina (Figure 12). *M. hyopneumoniae* DNA was detected in four animals
10
11 using ISH assay, mainly as labeled bacteria attached to the apical border of bronchial
12
13 and bronchiolar epithelial cells. *Mycobacterium* spp. bacilli were observed in all the
14
15 four sections stained with Zielh-Neelsen that showed granulomatous TB-like lesions
16
17 (Figure 13).
18
19

20
21 Five out of the 26 animals tested showed IHC or ISH positive cells for more than one of
22
23 the pathogens tested. Pathogen combinations obtained and histological lesions found in
24
25 them are shown in Table 3. In general, animals only infected with viruses (in single or
26
27 mixed infection) or single-infected with *M. hyopneumoniae*, showed mild infiltration of
28
29 inflammatory cells in alveolar septa and mild lymphoid hyperplasia. However, animals
30
31 that presented mixed infections with viruses and *M. hyopneumoniae* showed a severe
32
33 bronchopneumonia associated with interstitial pneumonia and presence of alveolar
34
35 exudates. In addition, one of these latest animals presented infected with *A.*
36
37 *pleuropneumoniae*.
38
39

40 41 42 **Discussion**

43
44 Results obtained in this work show that wild boar may be infected by the main
45
46 respiratory pathogens involved in PRDC. The presence of histopathological pulmonary
47
48 lesions was widely spread, finding lesions in 83.34% of the studied wild boar. However,
49
50 mean scores obtained to each histological parameter showed that the severity of the
51
52 found lesions was often mild, although individual cases with severe lung lesions were
53
54 also recorded.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The pathological outcomes produced by the respiratory pathogens assessed were
4
5 variable. On the one hand, wild boar infected with pathogens such as *M.*
6
7 *hyopneumoniae*, *H. parasuis* or *P. multocida* showed more severe pulmonary lesions
8
9 than non-infected animals. On the other hand, infections with *A. pleuropneumoniae* or
10
11 PCV2 and the presence of antibodies against SIV were not related with pulmonary
12
13 lesions.
14

15
16
17 Animals infected with *M. hyopneumoniae* showed significant higher amount of airways
18
19 and alveolar inflammatory exudates. These results are in agreement with a recent work
20
21 in which *M. hyopneumoniae* infections have been correlated with the presence of gross
22
23 pneumonic lesions in free ranging wild boar,⁹ and confirm that the presence of this
24
25 microorganism may also affect histopathological parameters.
26

27
28
29 Likewise, lesions found in animals infected with *H. parasuis* were similar to those
30
31 recently described in a young wild boar infected with this microorganism (severe
32
33 bronchopneumonia associated with interstitial pneumonia).⁸ The prevalence of *H.*
34
35 *parasuis* infection found in this work was low (4.7%), but interestingly most of the
36
37 infected animals were piglets (39.1% of piglet resulted infected). These results suggest
38
39 that *H. parasuis* infection may lead to pathological outcomes mainly in young animals
40
41 that, in addition, are most susceptible to respiratory pathogens.²⁷
42
43

44
45 On the other hand, animals infected by *P. multocida* showed higher amount of
46
47 bronchoalveolar exudates. The presence of abundant inflammatory infiltrates and
48
49 exudates in alveoli and airways lumen has been previously related with *P. multocida*
50
51 infection in swine.³⁰ However, this microorganism is considered as a secondary
52
53 respiratory pathogen and rarely produces severe lung lesions in single infections.²⁷ The
54
55 three wild boar in which *P. multocida* was detected were co-infected with other
56
57
58
59
60

1
2
3 pathogens such as *M. hyopneumoniae* or *H. parasuis* and, hence, *P. multocida* might
4
5 have played a role as a secondary respiratory pathogen in these infections.
6
7

8 The seropositivity against the main RNA viruses involved in PRDC seemed not to
9
10 influence the appearance of lung lesions in wild boar. The presence of antibodies
11
12 against these viruses suggests a previous contact with the pathogen, but it does not
13
14 necessarily mean a current infection. To have more accurate data, IHC and ISH assays
15
16 were carried out in parallel, to detect the presence of infected cells in lung tissue
17
18 sections.^{12,24}
19

20
21 The presence of SIV antigens was detected in only 5 (31.25%) out of the 16
22
23 seropositive animals tested. SIV infections in pigs are generally acute with an early
24
25 clearance of the virus,²⁶ and hence, it is not surprising not to find viral antigen in a
26
27 percentage of the seropositive animals.⁴³ In immunopositive animals against SIV,
28
29 positive reaction was detected just in a few cells, mainly alveolar macrophages but also
30
31 desquamated epithelial cells from bronchi and bronchioles. This fact could mean that
32
33 infected animals were in the process of clearing the virus.⁵
34
35
36

37
38 Even though no seropositive animals were detected for PRRSV, the presence of PRRSV
39
40 antigens was recorded in five out of 26 lung sections included in the IHC study
41
42 (19.23%). It has been proven that high levels of specific IgGs against PRRSV can be
43
44 detected in serum between seven to ten days post infection (dpi) and 300 dpi
45
46 approximately.⁴² For this reason, the accuracy of indirect ELISA assays based on the
47
48 detection of IgGs might be not very high in animals recently infected or infected more
49
50 than 300 days ago. Several studies have been carried out to detect the presence of
51
52 PRRSV in wild boar, and have been based on serological assays.^{20,38} Negative results
53
54 obtained in this kind of studies might be underestimating the real epidemiological
55
56 situation of PRRSV in wild boar populations. The combination of serology and
57
58
59
60

1
2
3 histopathological techniques, including the study of the presence of the pathogen *in situ*
4
5 may be very effective to get a better picture of the real epidemiological situation of
6
7 PRRSV infections in wild boar, like has been proven with other pathogens.^{22,29}
8
9

10 Regarding to PCV2 *in situ* diagnostic, immunohistochemistry assay (14 positive
11
12 animals) resulted more sensible than ISH assay (eight positive animals) to detect the
13
14 presence of PCV2 infected cells, as has been reported in previous works (Morandi *et al.*,
15
16 2010).
17

18
19 Co-Infections with some of the respiratory pathogens diagnosed *in situ*, were detected in
20
21 several lung samples. Co-infections with different respiratory pathogens may lead to
22
23 more severe pathological outcomes.²⁷ In fact, it has been suggested that interactions
24
25 between bacteria such as *M. hyopneumoniae*, and respiratory viruses may enhance the
26
27 development of lung lesions in domestic pigs.^{3,18,19,40} The results obtained in this work
28
29 seem to be in agreement with this theory. Thus, wild boar infected with one or more
30
31 viruses only showed a mild interstitial pneumonia and lymphoid hyperplasia; whereas
32
33 animals suffering mixed infections of viruses and *M. hyopneumoniae* showed a severe
34
35 bronchopneumonia associate to interstitial pneumonia.
36
37

38
39 In addition, other pathogens not frequently involved in PRDC development were related
40
41 with respiratory pathologies affecting wild boar. On the one hand, lesions associated to
42
43 lung nematodes were recorded in wild boar studied (Figure 14). Animals infected by
44
45 lung nematodes showed severe lymphoid hyperplasia and a severe bronchitis and
46
47 fibrosis as has been previously described in domestic pig.¹⁶ On the other hand,
48
49 granulomatous TB-like lesions were found in 20% of the population. Since it was not
50
51 included in the aims of this work, the presence of *Mycobacterium* spp. was not
52
53 systematically assessed in wild boar showing granulomatous TB-like lesions. However,
54
55 the presence of mycobacteria bacilli in all the four lung sections with granulomatous
56
57
58
59
60

1
2
3 lesions that were stained with Zielh-Neelsen stain, and the high percentage of
4
5 *Mycobacterium* spp. pulmonary infections recently reported in the studied area;³⁴
6
7 suggest that granulomatous lesions were caused by this kind of infection.
8
9

10 As a multifactorial disease, clinical signs presented in animals affected by PRDC
11
12 pathogens may be enhanced by several factors such as age or management practices. In
13
14 this work, more severe histological lesions were recorded in lungs belonging to piglets
15
16 (bronchoalveolar exudates), juveniles and yearling (peribronchial lymphoid hyperplasia)
17
18 wild boar, suggesting that pathological outcomes may be more severe in young animals.
19
20

21 In addition, the severity of clinical outcomes produced by swine respiratory pathogens
22
23 may be higher in farms with high density of animals and more intensive management
24
25 practices.²⁷ Currently, management practices such as fencing or supplying additional
26
27 food are common in wild boar breeding, leading to non-natural higher densities of
28
29 animals.¹⁵ The number of wild boar farms in which these measures are applied, is rising
30
31 around the world to solve a great demand of wild boar in meat industry¹⁷ and in the
32
33 game business.¹⁵ The impact of PRDC pathogens could be higher in these “intensively-
34
35 managed” farms leading to more severe clinical outcomes and producing serious
36
37 economic losses.
38
39
40

41 In conclusion, results obtained in this work show that infections with swine respiratory
42
43 pathogens such as *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* or *H. parasuis*, may lead to lung
44
45 lesions in wild boar. The presence of severe lung lesions in animals co-infected with
46
47 viruses and *M. hyopneumoniae* suggests that co-infections with respiratory pathogens
48
49 might enhance the severity of such pathological findings. However, more research
50
51 including a higher number of animals and taking into account other factors that may
52
53 influence the PRDC development (e.g. age or populational density), would be necessary
54
55 to elucidate it.
56
57
58
59
60

Acknowledgement

The authors acknowledge the Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España) PS0900513, Regional Government of Extremadura (PDT09A046 and GRU10142) and FEDER for funding this study. D. Risco has a Formación de Profesorado Universitario (FPU) grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2009-0704).

Conflict of Interest Statement

The authors declared that they had no conflict of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

References

- 1 Boitani L, Mattei L: Aging wild boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. In: Spitz F, Janeau G, González G, Aulagnier S, eds. *Ongules/Ungulates 91*. Toulouse: SFPEM-IRGM; 1992: 419-421.
- 2 Boye M, Jensen TK, Ahrens P, et al. In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *APMIS*. 2001;109(10):656-664.
- 3 Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL: Porcine Respiratory Disease Complex. In: Brogden KA GJ, ed. *NCBI Bookshelf*. Washington: ASM Press; 2002.
- 4 Brookes SM, Nunes A, Choudhury B, et al. Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non immune pigs. *PLoS ONE*. 2010;5:e9068.
- 5 Caswell JL, Williams KJ: Respiratory system. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007: 579-587.

- 1
2
3 6 Closa-Sebastiá F, Casas-Díaz E, Cuenca R, et al. Antibodies to selected pathogens in
4
5 wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *Eur J Wildl Res*.
6
7 2011;57(4):977-981.
8
9
10 7 Cságola A, Kecskeméti S, Kardos G, et al. Genetic characterization of type 2 porcine
11
12 circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol*. 2006;151(3):495-
13
14 507.
15
16
17 8 Cuesta JM, Risco D, Gonçalves P, et al. Fatal infection due to *Haemophilus parasuis*
18
19 in a young wild boar (*Sus scrofa*). *J Vet Diagn Investig*. 2013;25(2):297-300.
20
21
22 9 Chiari M, Ferrari N, Zanoni M, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* temporal trends of
23
24 infection and pathological effects in wild boar populations. *Eur J Wildl Res*.
25
26 2013.
27
28
29 10 Cho WS, Chae C. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene
30
31 in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ
32
33 hybridization. *Lett Appl Microbiol*. 2003;37(1):56-60.
34
35
36 11 Drew TW, Grierson SS, King DP, et al. Genetic similarity between porcine
37
38 circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa
39
40 and North American isolates. *Vet Rec*. 2004;155:149-151.
41
42
43 12 Ecco R, Lazzari AM, Guedes RMC. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*).
44
45 *Pesqui Vet Bras*. 2009;29(6):461-468.
46
47
48 13 García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, et al. Comparative
49
50 Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by
51
52 *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Trans Emerg Dis*.
53
54 2012;60(2):102-109.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 14 Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Barranco I, et al. Cytokine Expression by
4
5 Macrophages in the Lung of Pigs Infected with the Porcine Reproductive and
6
7 Respiratory Syndrome Virus. *J Comp Pathol.* 2010;142(1):51-60.
8
9
10 15 Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, et al. Disease risks and overabundance of
11
12 game species. *Eur J Wildl Res.* 2006;52(2):81-87.
13
14
15 16 Greve JH: Internal Parasites: Helminths. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A,
16
17 Schwartz K, Stevenson G, eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, Iowa: John
18
19 Wiley & Sons; 2012: 908-920.
20
21
22 17 Halli O, Ala-Kurikka E, Nokireki T, et al. Prevalence of and risk factors associated
23
24 with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *Vet J.* 2012.
25
26
27 18 Harms PA, Halbur PG, Sorden SD. Three cases of porcine respiratory disease
28
29 complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health and*
30
31 *Product.* 2002;10(1):27-30.
32
33
34 19 Kim J, Chae C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine
35
36 parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *Vet J.*
37
38 2004;167(1):104-106.
39
40
41 20 Kukushkin S, Baborenko E, Baybikov T, et al. Seroprevalence of antibodies to main
42
43 porcine infectious pathogens in wild boar in some regions of Russia. *Ank Univ*
44
45 *Vet Fak Derg.* 2009;5:147-152.
46
47
48 21 Landolt GA, Karasin AI, Phillips L, et al. Comparison of the Pathogenesis of Two
49
50 Genetically Different H3N2 Influenza A Viruses in Pigs. *J Clin Microbiol.*
51
52 2003;41:1936–1941.
53
54
55 22 Lari A, Lorenzi D, Nigrelli D, et al. Pseudorabies virus in European wild boar from
56
57 Central Italy. *J Wildl Dis.* 2006;42(2):319-324.
58
59
60

- 1
2
3 23 Maes D, Deluyker H, Verdonck M, et al. Herd factors associated with the
4
5 seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from
6
7 farrow-to-finish pig herds. *Vet Res.* 2000;31(3):313-327.
8
9
- 10 24 Morandi F, Verin R, Sarli G, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen
11
12 localisation and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in free-
13
14 ranging wild boar (*Sus scrofa ssp scrofa*) in Italy. *Eur J Wildl Res.*
15
16 2010;56(5):717-724.
17
18
- 19 25 Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose
20
21 *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Investig.* 2001;13(6):495-501.
22
23
- 24 26 Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, et al.: Swine Influenza. In: Straw B,
25
26 Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine.* 9th ed. Ames,
27
28 Iowa: Blackwell Publishing; 2006: 469-483.
29
30
- 31 27 Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in
32
33 pigs. *Anim Health Res Rev.* 2011;12(2):133-148.
34
35
- 36 28 Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, et al. Experimental reproduction of postweaning
37
38 multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma*
39
40 *hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2004;41(6):624-640.
41
42
- 43 29 Perez J, Fernández AI, Sierra MA, et al. Serological and immunohistochemical
44
45 study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet Rec.* 1998;143(5):136-
46
47 139.
48
49
- 50 30 Pijoan C: Pneumonic Pasteurellosis. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S,
51
52 Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine.* 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing;
53
54 2006: 719-726.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 31 Reiner G, Fresen C, Bronnert S, et al. Prevalence of *Actinobacillus*
4
5 *pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in germany. *J*
6
7 *Wildl Dis.* 2010;46(2):551-555.
8
9
- 10 32 Reiner G, Fresen C, Bronnert S, et al. Porcine Reproductive and Respiratory
11
12 Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Vet Microbiol.* 2009;136(3-
13
14 4):250-258.
15
16
- 17 33 Risco D, Fernández-Llario P, Cuesta JM, et al. Fatal outbreak of systemic
18
19 pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *J Vet*
20
21 *Diagn Investig.* 2013;25(6):791-794.
22
23
- 24 34 Risco D, Fernandez-Llario P, García-Jiménez WL, et al. Influence of Porcine
25
26 Circovirus Type 2 Infections on Bovine Tuberculosis in Wild Boar Populations.
27
28 *Trans Emerg Dis.* 2013.
29
30
- 31 35 Risco D, Fernandez-Llario P, Velarde R, et al. A case of exudative epidermitis in a
32
33 young wild boar from a Spanish game estate. *J Swine Health and Product.*
34
35 2013;21(6):304-308.
36
37
- 38 36 Risco D, Llario PF, Velarde R, et al. Outbreak of Swine Erysipelas in a Semi-
39
40 Intensive Wild Boar Farm in Spain. *Trans Emerg Dis.* 2011;58(5):445-450.
41
42
- 43 37 Rosell C, SegalÀ©s J, Plana-DurÀ©n J, et al. Pathological, immunohistochemical,
44
45 and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic
46
47 wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 1999;120(1):59-78.
48
49
- 50 38 Sattler T, Sailer E, Wodak E, et al. Serological detection of emerging viral
51
52 infections in wild boars from different hunting regions of Southern Germany.
53
54 *Tierarztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere.* 2012;40(1):27-32.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 39 Sibila M, Mentaberre G, Boadella M, et al. Serological, pathological and
4
5 polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in
6
7 the wild boar. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):214-218.
8
9
10 40 Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin*
11
12 *North Am Food Anim Pract.* 2001;17(3):551-565.
13
14
15 41 Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, et al. Development of PCR assays for species-
16
17 and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin*
18
19 *Microbiol.* 1998;36(4):1096-1100.
20
21
22 42 Venteo A, Rebollo B, Sarraseca J, et al. A novel double recognition enzyme-linked
23
24 immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of
25
26 European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol*
27
28 *Methods.* 2012;181(1):109-113.
29
30
31 43 Watanabe TTN, de Almeida LL, Wouters F, et al. Histopathological and
32
33 immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza a infection
34
35 in Brazil, 2009-2010. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32(11):1148-1154.
36
37
38
39
40

Request for Reprints

41
42
43 David Risco Pérez. Facultad de Veterinaria de Cáceres, Avenida de la Universidad s/n,
44
45 CP 10003, Cáceres, Spain.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Prevalence for the respiratory pathogens included in this study in piglets (0-6 months), juveniles (6–12 months), yearlings (13–24 months) and adult (over 24 months) male and female wild boar hunted harvested in south-western Spain.

Pathogen	Total Prevalence	Age-specific prevalence ^a
Viruses		
Porcine circovirus type 2	19.5% (n=210)	Piglets: 14.3% (n=18) Juveniles: 47.4% (n=19) Yearlings: 31.3% (n=48) Adults: 12.5% (n=112)
Swine influenza virus	23.3% (n=210)	Piglets: 14.3% (n=21) Juveniles: 15.8% (n=19) Yearlings: 12.5% (n=48) Adults: 33% (n=112)
PRRS virus	0 (n=72)	Piglets: 0% (n=2) Juveniles: 0% (n=7) Yearlings: 0% (n=15) Adults: 0% (n=48)
Bacteria		
<i>Haemophilus parasuis</i>	3.8% (n=210)	Piglets: 33.3% (n=21) Juveniles: 0% (n=19) Yearlings: 0% (n=48) Adults: 0.9% (n=112)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	6.2% (n=213)	Piglets: 4.8% (n=21) Juveniles: 0% (n=19) Yearlings: 6.3% (n=48) Adults: 5.4% (n=112)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	24.8% (n=210)	Piglets: 33.3% (n=21) Juveniles: 36.8% (n= 19) Yearlings: 27.1% (n=48) Adults: 21.4 (n=112)
<i>Pasteurella multocida</i>	1.4% n=209	Piglets: 14.3% (n=21) Juveniles: 0% (n=19) Yearlings: 2.1% (n=48) Adults: 0% (n=112)

^a Ten out of the studied animals were not included in the estimation of prevalences by age since their ages were unknown

Table 2. Mean scores obtained to five pulmonary pathological parameters studied in positive and negative animals against each respiratory pathogen.

	SIV		PCV2		<i>M.hypneumoniae</i>		<i>H.parasuis</i>		<i>A.pleuropneumoniae</i>		<i>P.multocida</i>		Nematodes	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Alveolar Septal Infiltration	1.05	0.94	1.07	0.83	1.12	0.73	0.99 ^a	2 ^a	1.01	1.31	1	1.33	1.06	0.5
Bronchoalveolar exudates	0.47	0.33	0.43	0.46	0.27 ^a	0.94 ^a	0.32 ^a	3.25 ^a	0.44	0.38	0.39 ^a	2 ^a	0.41 ^a	0.75 ^a
Peribronchial lymphoid hyperplasia	1.81	1.55	1.14	0.31	1.68	1.96	1.79	0.88	1.75	1.77	1.74	1.33	1.68 ^a	3 ^a
Lamina propria inflammation	0.6	0.39	0.09	0.19	0.46	0.83	0.56	0.25	0.53	0.77	0.53	0	0.42 ^a	2.67 ^a
Necrosis of epithelial cells	0.07	0.06	0.09	0	0.08	0.06	0.07	0	0.08	0	0.07	0	0.07	0

^a Difference statistically significant ($p < 0.05$) between mean score obtained in positive and negative animals

Table 3. Pathogens and lesions found in immunohistochemical and *in situ* Hybridization assays against *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV), Swine Influenzavirus (SIV) and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2).

Pathogen combination	N	Lesional Score	Histopathological lesions description
<i>Single Infections</i>			
<i>MHYO</i>	2	3	Mild lymphoid hyperplasia
<i>PRRSV</i>	2	4.5	Mild infiltration of inflammatory cells in alveolar septa and mild lymphoid hyperplasia
<i>PCV2</i>	9	4.22	Mild foci of inflammatory infiltrate in alveolar septa and mild to severe lymphoid hyperplasia
<i>Mixed Infections</i>			
<i>PCV2+SIV</i>	1	1	Mild focus of inflammatory infiltrate in alveolar septa
<i>PCV2+SIV+PRRSV</i>	2	4.5	Severe lymphoid hyperplasia
<i>PCV2+SIV+MHYO+APP</i>	1	20	Severe bronchopneumonia and interstitial pneumonia with presence of abundant exudates
<i>PCV2+SIV+PRRSV+MHYO</i>	1	10	Severe bronchitis with inflammatory infiltrates in the lamina propria, lymphoid hyperplasia and presence of alveolar exudates.

Figure Legends

Fig. 1. Localization of the 20 game estates from south-western Spain included in this study.

Fig. 2. Lung tissue. Infiltration of inflammatory cells in alveolar septa. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 3. Lung tissue. Airways exudates mainly formed by macrophages and neutrophils. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 4. Lung tissue. Severe lymphoid hyperplasia of bronchiolar associated lymphoid tissues. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 5. Lung tissue. Inflammatory infiltrates within the broncholar lamina propria. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 6. Lung tissue. Nuclear pyknosis associated to necrosis of bronchiolar epithelial cells. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 7. Lung tissue. Tuberculosis like granulomatous lesions. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 8. Mean score values obtained for each histopathological parameter assessed in each age group. Asterisks show differences statistically significant ($p < 0.05$) in mean lesional parameters between age groups

Fig. 9. Lung tissue. Numerous macrophages immunomarked against PCV2 within BALT. IHC, Mayer's hematoxylin counterstain.

Fig. 10. Lung tissue. Numerous macrophages positive against PCV2 detected by *in situ* hybridization assay. ISH, Red counterstain.

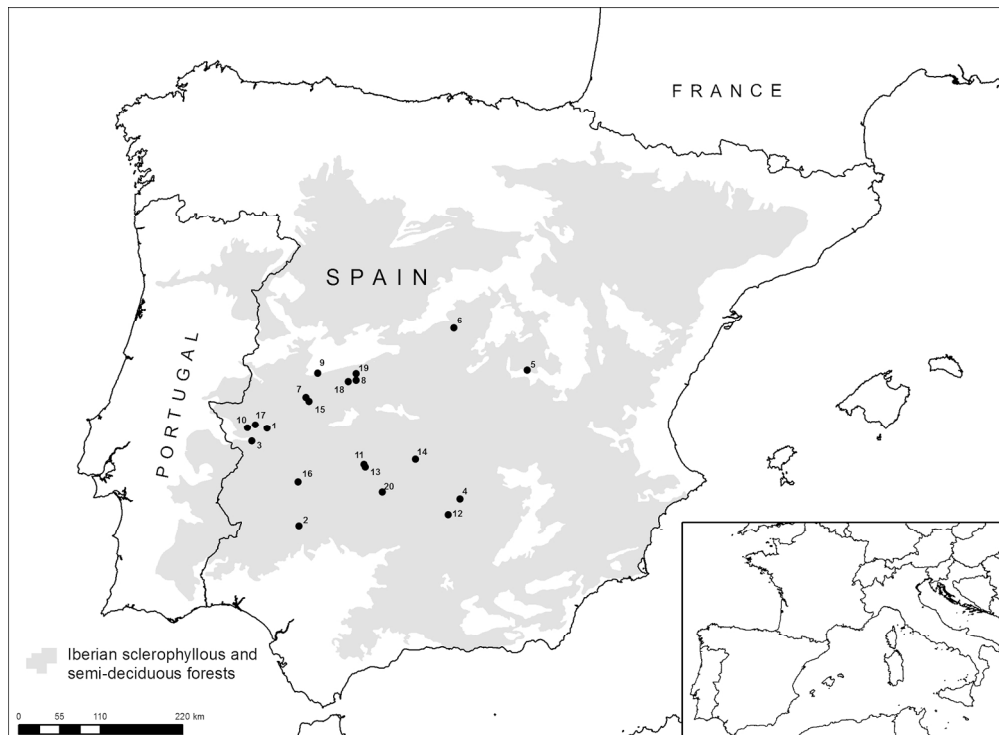
1
2
3 **Fig. 11.** Lung tissue. Epithelial cells and macrophages immunomarked against SIV.
4
5 IHC, Mayer's haematoxylin counterstain.
6
7

8 **Fig. 12.** Lung tissue. Cluster of macrophages immunomarked against PRRSV. IHC,
9
10 Mayer's haematoxylin counterstain.
11

12
13 **Fig. 13.** Lung tissue. Acid-Fast bacilli within the cytoplasm of a Multinucleated giant
14
15 cell in a granulomatous lesion. Zhiel-Neelsen stain.
16
17

18 **Fig. 14.** Lung tissue. Nematodes within the airway. Haematoxylin and Eosine stain.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Localization of the 20 game estates from south-western Spain included in this study.
168x123mm (300 x 300 DPI)

Review

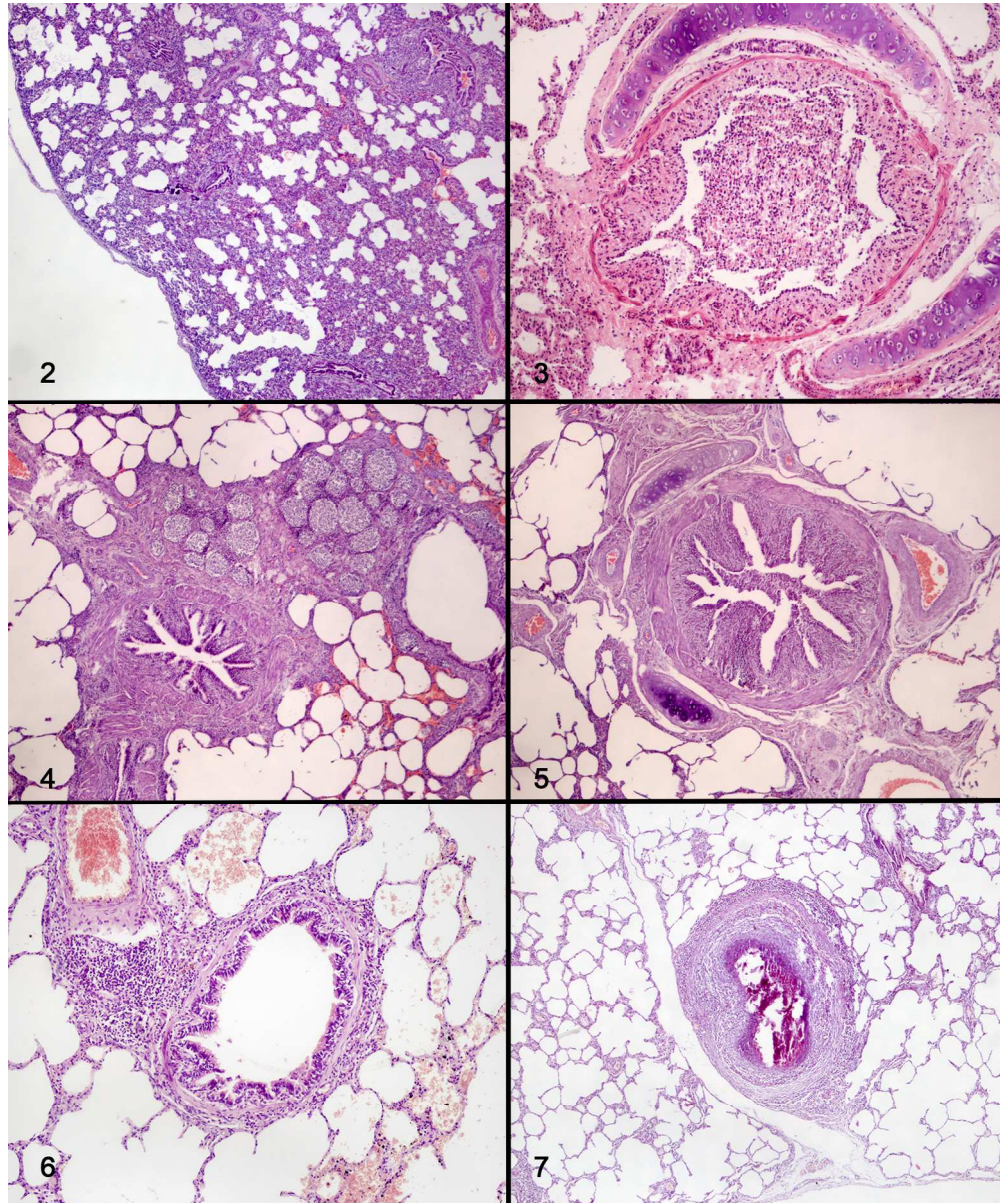


Fig. 2. Lung tissue. Infiltration of inflammatory cells in alveolar septa. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 3. Lung tissue. Airways exudates mainly formed by macrophages and neutrophils. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 4. Lung tissue. Severe lymphoid hyperplasia of bronchiolar associated lymphoid tissues. Haematoxylin and Eosine stain.

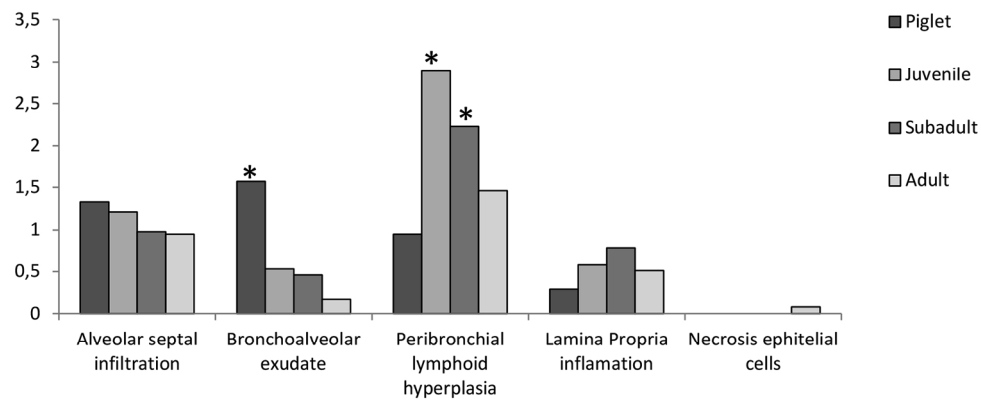
Fig. 5. Lung tissue. Inflammatory infiltrates within the bronchiolar lamina propria. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 6. Lung tissue. Nuclear pyknosis associated to necrosis of bronchiolar epithelial cells. Haematoxylin and Eosine stain.

Fig. 7. Lung tissue. Tuberculosis like granulomatous lesions. Haematoxylin and Eosine stain.

175x209mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Mean score values obtained for each histopathological parameter assessed in each age group. Asterisks show differences statistically significant ($p < 0.05$) in mean lesional parameters between age groups

168x77mm (300 x 300 DPI)

Peer Review

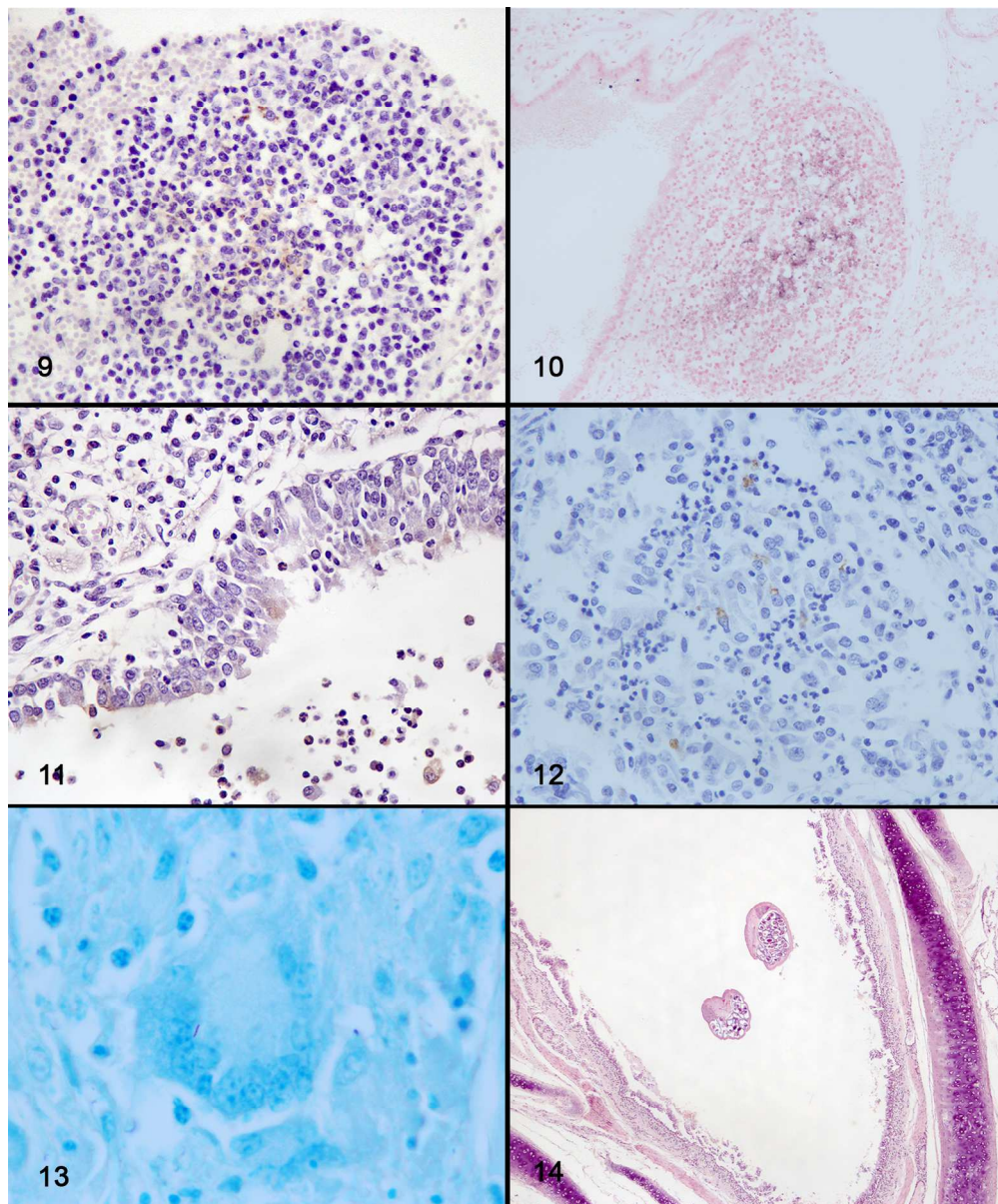


Fig. 9. Lung tissue. Numerous macrophages immunomarked against PCV2 within BALT. IHC, Mayer's hematoxylin counterstain.

Fig. 10. Lung tissue. Numerous macrophages positive against PCV2 detected by in situ hibrization assay. ISH, Red counterstain.

Fig. 11. Lung tissue. Epithelial cells and macrophages immunomarked against SIV. IHC, Mayer's haematoxylin counterstain.

Fig. 12. Lung tissue. Cluster of macrophages immunomarked against PRRSV. IHC, Mayer's haematoxylin counterstain.

Fig. 13. Lung tissue. Acid-Fast bacilli within the cytoplasm of a Multinucleated giant cell in a granulomatous lesion. Zhiel-Neelsen stain.

Fig. 14. Lung tissue. Nematodes within the airway. Haematoxylin and Eosine stain.

175x209mm (300 x 300 DPI)

Bloque II

Efecto de las infecciones concomitantes por diferentes patógenos en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Consecuencias sanitarias e implicación en medidas de control

4. Bloque II: Efecto de las infecciones concomitantes por diferentes patógenos en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Consecuencias sanitarias e implicación en medidas de control

El término coinfección (también llamada infección concomitante o poliparasitismo) se emplea para referirse a la infección simultánea de un mismo hospedador por dos o más patógenos. Las coinfecciones están ampliamente extendidas ya que la mayoría de los hospedadores, incluidos los humanos, presentan frecuentemente infecciones sincrónicas por diversos patógenos con los que entran en contacto a lo largo de un periodo de tiempo (Pérez y cols., 2006). El desarrollo de estas coinfecciones es fruto de dos hechos principalmente: 1) la presencia simultánea de diferentes patógenos en los mismos ambientes, lo que facilita un contagio simultáneo; y 2) la facilidad que muchos patógenos encuentran para proliferar en hospedadores previamente infectados con otros agentes (Hatcher y cols., 2011).

El efecto que los patógenos concomitantes producen en el desarrollo de una enfermedad determinada puede tener, en muchas ocasiones, una base inmunológica. El organismo desarrolla diferentes tipos de respuesta inmunológica para enfrentarse a los diversos patógenos. Así, por ejemplo, los linfocitos T helper (Th) inmaduros pueden diferenciarse en linfocitos Th1 que sobre todo protegen frente microparásitos (ej. protozoos, bacterias y virus) o en linfocitos Th2 que ayudan a combatir parásitos extracelulares principalmente (ej. helmintos) (Graham y cols., 2007; Supali y cols., 2010). Curiosamente, estas dos respuestas inmunológicas tienen sistemas de regulación opuestos. Así, cuando un organismo está desarrollando una respuesta Th2 frente a un parásito extracelular y es coinfectado por otro patógeno que necesita una respuesta Th1 para ser combatido, el hospedador se ve en dificultades para montar una respuesta inmune Th1 eficaz, por lo que se favorece la proliferación de este

segundo patógeno (Elias y cols., 2005b). De acuerdo con esto, las consecuencias que un determinado patógeno produce en su hospedador estarán condicionadas por la existencia de infecciones previas con otros agentes.

Este tipo de interacciones entre patógenos está comenzando a ser estudiado al detalle e incluso, fruto de los conocimientos adquiridos sobre esta cuestión, se están elaborando medidas de control frente a determinadas enfermedades. Así, en los últimos años se han experimentado novedosas medidas de lucha frente a enfermedades como la malaria, basadas en la eliminación de patógenos concomitantes que pueden influir en el desarrollo de esta enfermedad (Nkuo-Akenji, 2006; Boel, 2010). Sin embargo, aún serán necesarias más investigaciones para poder valorar el efecto real de este tipo de medidas.

En este sentido, una enfermedad como la tuberculosis y un hospedador como el jabalí nos proporcionan el marco perfecto para valorar el efecto que las coinfecciones con otros patógenos puede tener en el desarrollo de dicha enfermedad.

La idoneidad del modelo jabalí-tuberculosis para el estudio de las coinfecciones se fundamenta en varios hechos contrastados. En primer lugar, la tuberculosis es una enfermedad cuyo desarrollo puede verse influido por la presencia de patógenos concomitantes. Esto ha sido demostrado en numerosos trabajos de investigación. Así, por ejemplo, es bien conocido que uno de los mayores factores de riesgo para padecer tuberculosis humana es la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Pawlowski y cols., 2012). Este virus afecta gravemente al sistema inmune del hospedador favoreciendo el desarrollo de formas clínicas de tuberculosis más graves y reactivando infecciones tuberculosas que se encontraban en estado de latencia (Pawlowski y cols., 2012). Además, se ha comprobado que los cuadros clínicos encontrados en personas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* son más graves cuando existen coinfecciones con determinados parásitos (Li y cols., 2013). Por otro lado, la influencia que diferentes patógenos tienen en el desarrollo de la tuberculosis también ha sido descrita en animales salvajes como el búfalo africano (Ezenwa y cols., 2010).

En segundo lugar, el jabalí es un animal en el que las coinfecciones son muy frecuentes. En esta especie se han encontrado elevadas prevalencias frente a diversos patógenos entre los que se encuentran las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Closa-Sebastiá y cols., 2011; García-Jiménez y cols., 2012a). Esto nos proporciona un escenario en el que los animales afectados por tuberculosis pueden estar coinfectados por un elevado número de agentes transmisibles adicionales, permitiéndonos explorar cómo una amplia comunidad de patógenos puede influir en el desarrollo de una enfermedad concreta como es la tuberculosis.

Por último, y lo que es más importante, el estudio del efecto de las coinfecciones en la tuberculosis del jabalí abre una vía para el desarrollo de nuevas soluciones a un problema que tiene un gran impacto económico a escala mundial, como es la influencia negativa que tiene este reservorio silvestre de tuberculosis en los planes de erradicación de esta enfermedad (Hermoso de Mendoza y cols., 2006).

4.1 Influencia del circovirus porcino tipo 2 en la tuberculosis bovina en poblaciones de jabalíes. (*Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations*).

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica ampliamente extendida y que tiene una gran importancia sanitaria y económica (Good y cols., 2011). Debido a esta importancia, actualmente muchos países están desarrollando medidas de lucha frente a esta enfermedad encaminadas a su erradicación total (Schiller y cols., 2011).

En España, pese a la gran cantidad de recursos humanos y económicos que se han dedicado en los últimos años al control de la tuberculosis bovina, todavía existen zonas en las que las prevalencias están bastante lejanas del 0.1 % requerido para considerarla erradicada (Allepuz y cols., 2011).

Las altas prevalencias de tuberculosis bovina encontradas en el suroeste del país se han relacionado con la existencia de reservorios silvestres de esta enfermedad como el ciervo y el jabalí (Gortázar y cols., 2005). Este último está considerado como el principal reservorio de tuberculosis en los sistemas mediterráneos (Hermoso de Mendoza y cols., 2006).

Los factores que pueden favorecer la existencia de altas prevalencias de esta enfermedad en el jabalí han sido estudiados. Así, factores como la densidad poblacional (Gortázar y cols., 2006), la edad (Vicente y cols., 2004) o factores individuales (Acevedo-Whitehouse y cols., 2005), han sido vinculados con altas prevalencias de tuberculosis en jabalí. Sin embargo, la influencia que pueden tener las coinfecciones con otros patógenos en el desarrollo de esta enfermedad no ha sido aún valorada, pese a que algunos trabajos sugieren que patógenos como el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) pueden agravar el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí (Vicente y cols., 2004). Este virus, ampliamente extendido en las poblaciones de jabalíes, puede provocar una supresión del sistema inmune de los animales infectados, favoreciendo el desarrollo de otras enfermedades concomitantes (Cságola y cols.,

2006). Los objetivos de este trabajo fueron valorar la relación existente entre las prevalencias de tuberculosis y PCV2 en poblaciones de jabalíes del suroeste de España y analizar si la presencia de coinfecciones con PCV2 influye en el desarrollo lesional de la tuberculosis en el jabalí.

Este trabajo se desarrolló en 11 fincas del suroeste de España con un historial conocido de tuberculosis en jabalí. Todas estas fincas estaban completamente valladas y presentaban una densidad de animales de entre 6.5 y 32 jabalíes por cada 100 hectáreas. En estas fincas se analizaron un total de 551 jabalíes abatidos en diferentes monterías. En todos ellos, se valoró la presencia de lesiones visibles compatibles con tuberculosis (LVTB) realizando una inspección sistemática de los principales linfonodos, órganos torácicos y abdominales. La prevalencia de tuberculosis en cada finca se estimó calculando el porcentaje de animales que presentaban LVTB.

Por otra parte, y basándonos en las LVTB encontradas, se determinó el patrón lesional mostrado por cada uno de los animales afectados por tuberculosis: localizado (animales que sólo mostraron LVTB en un órgano (normalmente linfonodos de la cabeza) o generalizado (animales que presentaban LVTB en más de un órgano). Posteriormente se obtuvo el porcentaje de animales con patrón lesional generalizado en cada finca (número de animales con LVTB generalizada/Total animales con LVTB)*100.

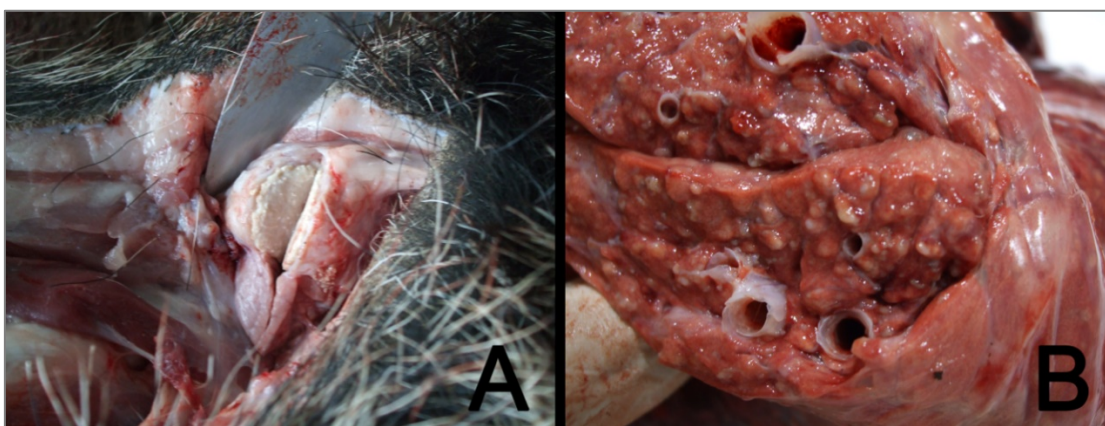


Imagen 18: Lesiones macroscópicas de tuberculosis en jabalí. A) Jabalí con tuberculosis localizada mostrando lesión en nódulos linfáticos submandibulares. B) Jabalí con tuberculosis generalizada mostrando múltiples lesiones de tuberculosis en el parénquima pulmonar.

Además, para confirmar el diagnóstico de tuberculosis realizado mediante inspección macroscópica, un porcentaje de los animales fueron sometidos a un estudio microbiológico e histopatológico. De todos ellos se obtuvieron los linfonodos mandibulares y una sección de tejido pulmonar. Una porción de estas muestras fue fijada en formaldehído y procesada rutinariamente para un estudio histopatológico en el que se determinó la presencia de granulomas tuberculosos. Del mismo modo, del material procedente de ambos órganos se realizó un cultivo microbiológico para determinar la presencia de *Mycobacterium* spp. Las colonias sospechosas fueron confirmadas como *Mycobacterium* spp. mediante PCR y genotipadas mediante *Spoligotyping* (García-Jiménez y cols., 2012a).

Por otra parte, para determinar la prevalencia de PCV2 en cada finca se seleccionaron un total de 20 animales (cuando el número de animales abatidos lo permitió), de los cuales se obtuvo una porción de sus linfonodos inguinales para valorar la presencia del virus mediante un ensayo PCR específico (Cságola y cols., 2006). Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas diagnósticas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Prevalencias de tuberculosis (TB) y PCV2 encontradas en las fincas objeto de estudio. Densidad relativa de jabalíes (animales cazados/100 ha) y porcentaje de animales que presentan TB generalizada.

Finca	Densidad Relativa de Jabalí	Prevalencia TB				Prevalencia PCV-2		
		Animales estudiados	Animales con lesiones de TB	Prevalencia	Porcentaje de animales con TB generalizada	Animales estudiados	Animales Positivos	Prevalencia
1	25	49	30	61.22 %	23.33 %	20	14	70 %
2	8	11	10	90.9 %	30 %	11	6	54.54 %
3	6.5	11	11	100 %	18.18 %	11	11	100 %
4	25	110	68	61.81 %	25 %	20	17	85 %
5	24	56	44	78.57 %	45.45 %	20	15	75 %
6	26	64	29	45.3 %	17.24 %	20	8	40 %
7	25.5	57	5	8.7 %	20 %	20	10	50 %
8	23	34	1	2.9 %	0 %	20	4	20 %
9	32	45	2	4.4 %	0 %	20	0	0 %
10	13	66	1	1.51 %	0 %	20	4	20 %
11	17	48	33	68.75 %	0 %	20	0	0 %
Total		551	234	47.64 %		202	89	46.78 %

Los análisis estadísticos realizados con los datos obtenidos, fueron encaminados a cumplir tres objetivos:

-Estudiar la relación entre las prevalencias de PCV2 y tuberculosis encontradas en las fincas objeto de estudio. Para conseguir esto se plantean una serie de modelos estadísticos en los que la variable respuesta (y) fue la prevalencia de tuberculosis y en los que se incluyen como posibles variables explicativas (x) la prevalencia de PCV2 encontrada en la finca o la densidad de jabalíes. Una vez planteados todos los modelos lógicos con estas variables, se eligió el modelo estadísticamente más adecuado basándonos en el criterio teórico-informativo de Akaike (AIC).

-Valorar la relación entre el porcentaje de animales con lesiones tuberculosas generalizadas y la prevalencia de tuberculosis en cada finca. Para cumplir este objetivo llevamos a cabo un procedimiento idéntico al explicado en el apartado anterior, sólo cambiando las variables que se introdujeron en los modelos. La variable respuesta (y) fue de nuevo la prevalencia de tuberculosis encontrada en cada finca, mientras que las variables explicativas fueron el porcentaje de animales que mostraron una tuberculosis generalizada y la densidad de jabalíes.

-Analizar el efecto que las coinfecciones con PCV2 producen en el desarrollo lesional de la tuberculosis. Para este análisis utilizamos los 39 animales en los que la presencia de *Mycobacterium* spp. fue demostrada microbiológicamente y en los cuales se realizó además el diagnóstico de PCV2 en linfonodo inguinal. Para poder ver la influencia de PCV2 en el desarrollo lesional de la tuberculosis se utilizó un planteamiento estadístico basado en desarrollo de los denominados “*tree models*”. En este caso la variable respuesta fue “tipo de patrón lesional” una variable categórica con dos posibles valores: “localizado” o “generalizado”. Por su parte, fueron incluidas como posibles variables explicativas el sexo, la edad y la presencia de PCV2. El modelo inicialmente obtenido con estas variables fue simplificado mediante un criterio de parsimonia.

Los análisis estadísticos mostraron que, en el primer caso, el modelo que mejor explicaba la prevalencia de tuberculosis fue el que incluía la prevalencia de PCV2 como

única variable explicativa. Por su parte en el segundo caso, el modelo seleccionado para explicar la prevalencia de tuberculosis fue el que incluía como única variable explicativa el porcentaje de animales con lesiones generalizadas.

Tabla 4: Selección de modelos para explorar la influencia de la prevalencia de PCV2 y el porcentaje de animales con lesiones generalizadas de TB (PGLP) en la prevalencia de tuberculosis de las 11 fincas estudiadas. Los modelos planteados fueron modelos lineales generalizados (GLM). K= número de parámetros incluidas las intersecciones. AICc = Criterio informativo de Akaike para muestras pequeñas, Δ_i = diferencia de AICc con respecto al mejor modelo, w_i = Peso específico del modelo.

Modelo biológico	K	AICc	Δ_i	w_i
<i>Prevalencia PCV Vs Prevalencia TB</i>				
Prevalencia PCV	2	17.11	0	0.46222
Modelo nulo	1	17.81	0.70	0.32538
Densidad relativa de jabalí	2	18.98	1.87	0.18106
Prevalencia PCV + Densidad relativa de jabalí	5	22.54	5.43	0.03062
Prevalencia PCV * Densidad relativa de jabalí	4	30.02	12.91	0.00073
<i>Porcentaje de patrones lesionales generalizados (PGLP) Vs Prevalencia TB</i>				
PGLP	2	15.97	0	0.35
PGLP * Densidad relativa de jabalí	5	16.48	0.51	0.27
Modelo nulo	1	17.48	1.51	0.17
Densidad relativa de jabalí	2	17.82	1.85	0.14
PGLP * Densidad relativa de jabalí	4	19.21	3.24	0.07

Por último, el *tree model* elegido para explicar los factores de riesgo asociados a la presencia de patrones lesionales generalizados incluyó dos variables explicativas: presencia de PCV2 y la edad. Así, en el modelo se puede observar cómo las mayores probabilidades de mostrar un patrón lesional generalizado las presentan los animales infectados por PCV2 y que a su vez son menores de 2.25 años (Imagen 19).

Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una relación entre las prevalencias de tuberculosis y las prevalencias de PCV2 en las poblaciones estudiadas. La prevalencia de PCV2 parece correlacionar mejor con la prevalencia de tuberculosis que otras variables previamente relacionadas con este parámetro, como puede ser la

densidad poblacional (Gortázar y cols., 2005). En las 11 fincas estudiadas, no todas mostraron una alta densidad de animales asociada a altas prevalencias de tuberculosis, lo que indica que otros factores podrían estar modulando el efecto de la densidad en la prevalencia de tuberculosis.

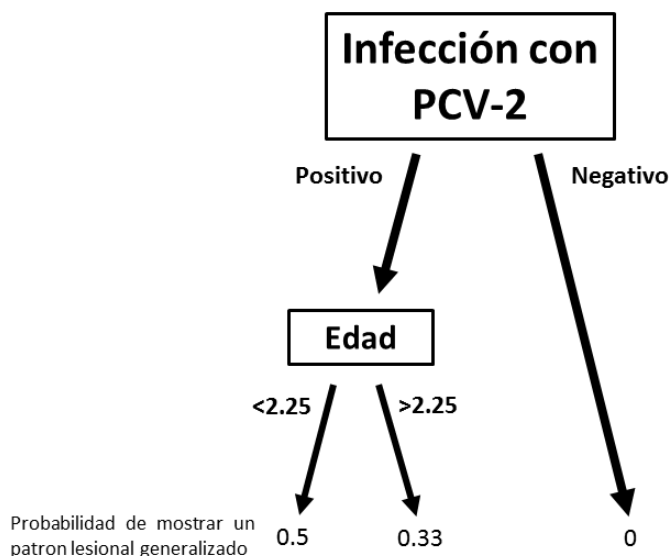


Imagen 19: *Tree model* en el que se muestran los principales factores de riesgo que explican la presencia de patrones lesionales generalizados de tuberculosis en el jabalí.

La interacción entre PCV2 y otros patógenos ha sido ya descrita en varias ocasiones. Por un lado está demostrado que las coinfecciones con otros patógenos como el parvovirus porcino o *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden agravar el cuadro clínico provocado por las infecciones de PCV2 en los individuos coinfectados (Opriessnig y cols., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que las coinfecciones con PCV2 pueden agravar los cuadros clínicos de enfermedades como la epidermitis exudativa (Wattrang y cols., 2002).

En nuestro estudio, los animales coinfectados con PCV2 y *Mycobacterium* spp. mostraron más probabilidades de desarrollar un cuadro de tuberculosis generalizada. El efecto que las infecciones por PCV2 ejercen en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí podría tener una base inmunológica. Las infecciones por PCV2 pueden dar lugar a un estado de inmunosupresión (Cságola y cols., 2006), que podría favorecer la

diseminación sistémica de la micobacteria. Sin embargo, serán necesarias más investigaciones valorando parámetros inmunológicos para comprobar esta hipótesis.

La edad también parece influir en la probabilidad de desarrollar un cuadro más grave de tuberculosis en el jabalí. Así, los animales infectados por PCV2 y menores de 2.5 años mostraron las mayores posibilidades de presentar una tuberculosis generalizada. Esto podría deberse a que las infecciones con PCV2 parecen tener mayores repercusiones clínicas en los animales menores de 2 años (Segalés y cols., 2006). Además los 2.5 años es una edad clave en el jabalí ya que es la edad a la que este animal completa su desarrollo corporal (Rosell, 1998).

Nuestros resultados muestran también cómo la prevalencia de tuberculosis es más elevada en las fincas con un mayor porcentaje de animales con cuadros generalizados. La presencia de estos patrones lesionales puede estar relacionada con una incapacidad del sistema inmune para contener la micobacteria y, por lo tanto, las posibilidades de excreción pueden ser mayores en los animales que presentan este tipo de lesiones (Gavier-Widen y cols., 2001). La relación entre las infecciones por PCV2 y la presencia de estos patrones lesionales podría explicar por qué en las fincas con mayores prevalencias de PCV2 se observaron mayores prevalencias de tuberculosis.

La relación planteada entre PCV2 y tuberculosis en jabalí podría ser utilizada en la lucha frente a la tuberculosis en este animal. Esta relación sugiere que el empleo de medidas encaminadas a reducir el impacto del PCV2 en el jabalí podría ser útil a la hora de luchar contra la tuberculosis.

ORIGINAL ARTICLE

Influence of Porcine Circovirus Type 2 Infections on Bovine Tuberculosis in Wild Boar Populations

D. Risco¹, P. Fernández-Llario¹, W. L. García-Jiménez¹, P. Gonçalves¹, J. M. Cuesta¹, R. Martínez¹, C. Sanz², M. Sequeda³, L. Gómez¹, J. Carranza^{1,4} and J. Hermoso de Mendoza¹

¹ Red de Grupos de Investigación Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

² Servicio de Sanidad Animal, Dirección General de Agricultura y Ganadería, Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía, Mérida, Spain

³ Servicio de Recursos Cinegéticos y Piscícolas, Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía, Mérida, Spain

⁴ Cátedra de Recursos Cinegéticos y Piscícolas, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

Keywords:

bovine tuberculosis; co-infection; porcine circovirus; wild boar

Correspondence:

D. Risco. Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria-UJEX, Avda. Universidad sn, E-10003, Cáceres, Spain. Tel.: +34927257114; Fax: +927257110; E-mail: riscope@unex.es

Received for publication November 30, 2012

doi:10.1111/tbed.12112

Summary

The wild boar is an important reservoir of bovine tuberculosis (bTB) in south-western Spain. Some risk factors such as wild boar density or age have been associated with the presence of high prevalences of bTB in wild boar. However, the influence of other risk factors such as co-infections with other pathogens has not yet been studied. This work aims to assess the influence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection on bTB prevalence and bTB lesional patterns observed in wild boar. The presence of bTB-like lesions was evaluated in 551 hunted wild boar from 11 different game estates in south-western Spain, with a known history of bTB. Tuberculosis prevalences in each estate were calculated based on the percentage of animals found with bTB-like lesions. The percentage of animals with generalized bTB lesional patterns (bTB lesions in more than one organ) was also assessed. The prevalence of PCV-2 was studied in each estate using a specific PCR assay. The relationship between PCV-2 and bTB prevalences and between PCV-2 infections and the presence of generalized lesional patterns in wild boar were analysed. A statistical relationship between the prevalences of bTB and PCV-2 was found, with bTB prevalences being higher in estates where prevalences of PCV-2 were high. On the other hand, animals infected with PCV-2 were more likely to develop a generalized lesional pattern. Porcine circovirus type 2 prevalences seem to be associated with prevalences of bTB in wild boar. PCV-2 infection may aggravate the development and severity of bTB, favouring the presence of generalized lesional patterns and raising the risk of contagion in these estates. The implementation of sanitary measures that focus on the control of PCV-2 infection may be necessary as a preliminary measure in bTB control programmes for wild boar.

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic infectious disease that causes significant economic losses worldwide (Good et al., 2011). Due to its widespread distribution and its sanitary and economic impact, preventive animal health programmes for bTB eradication, mainly based on test and

slaughter policies and/or abattoir surveillance, are being carried out in different countries (Schiller et al., 2011; Rodríguez-Prieto et al., 2012).

In Spain, despite the large amount of human and financial resources annually invested in bTB control, there are certain areas in which the number of infected herds is nearly unchanged and far from the <0.1% herd

prevalence required to eradicate the disease (Allepuz et al., 2011). Thus, in 2010, whereas the islands and the north-eastern regions of Spain were nearly free of tuberculosis (prevalence between 0.14% and 0.81%), the herd prevalence in some regions of central, southern and western Spain was considerably higher (e.g. 7.22% in Comunidad de Madrid) (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2011).

High prevalence of bTB in cattle herds in south-western Spain has been associated with wild ungulates, mainly wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*), due to their role as bTB reservoirs (Gortázar et al., 2005; Hermoso de Mendoza et al., 2006). The number of wild ungulates has significantly risen in south-western Spain in recent years as the hunting industry is an important economic activity in this area. However, effective sanitary programmes have not been implemented in these populations (Gortázar et al., 2006) and today the prevalence of bTB in wild boar and red deer is very high (16% in red deer and 50% in wild boar) (Gortázar et al., 2012).

Wild boar is considered the main bTB wildlife reservoir in Mediterranean ecosystems (Parra et al., 2003; Hermoso de Mendoza et al., 2006; Naranjo et al., 2008). The risk factors that may predispose this species to high prevalence of bTB have been widely studied (Gortázar et al., 2011). Factors such as high population density (Gortázar et al., 2006), age (Vicente et al., 2006) or individual susceptibility (Acevedo-Whitehouse et al., 2005) have been associated with high prevalence of this disease in wild boar. However, no studies have been published on the influence that co-infections with other pathogens (mainly viruses) may have on the development of bTB in wild boar.

In this sense, it has been suggested that porcine circovirus infection may trigger the development of bTB in wild boar (Vicente et al., 2004). Porcine Circovirus type 2 (PCV-2) is widespread in Spanish wild boar (Vicente et al., 2004). The susceptibility of wild boar to the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with clinical signs and lesions resembling those described in domestic pigs has been shown (Schulze et al., 2004). The characteristic lymphocyte depletion of this viral infection may affect the immune system of wild boar leading to immunosuppression and aggravation of concomitant infections (Cságola et al., 2006). Thus, lesional patterns in animals affected by bTB and co-infected with PCV-2 might be more severe.

The aims of this work were to assess the relationship between bTB and PCV-2 prevalences in 11 wild boar populations in south-western Spain and to study whether the presence of PCV-2 infections influences the development of the lesional patterns of wild boar affected by bTB.

Material and Methods

Sampling sites

This study was carried out on 11 wild boar populations in south-western Spain with a known history of bTB, bacteriologically and histopathologically confirmed. In this area, the average annual precipitation reaches 623 mm and is concentrated in the months of November–April. The mean annual temperature averages 17.7°C, January being the coldest and July the warmest month of the year. The vegetation is characterized by abundant *Quercus ilex* and *Q. suber* forests with understoreys dominated by *Quercus coccifera*, *Cistus ladanifer* and *Erica arborea*.

All the studied estates were fenced areas mainly for the purpose of wild boar hunting, although in some of them, wild boar shared the habitat with other wild ungulates such as red deer or fallow deer. Relative density of wild boar populations was estimated in each estate from the number of wild boar hunted per km². These types of estimations may be useful in the populations under study as they were not biased by hunting restrictions in the number, sex or age of the animals. In addition, all of the estates were managed under similar hunting techniques (Fernández-Llario et al., 2003; García-Jiménez et al., 2013). Relative density of wild boar in the estates ranged between 6.5 and 32 wild boar per 100 ha (Table 1).

Bovine tuberculosis prevalence and lesional pattern assessment

The presence of bTB-like lesions (VLTB) was evaluated in 551 hunted wild boar between October 2011 and February 2012. The number of animals analysed in each estate is shown in Table 1. Necropsy examination of all animals was performed in the field with detailed macroscopic inspection of lymph nodes, and abdominal and thoracic organs. This routine examination included the incision of retropharyngeal and mandibular lymph nodes, the incision of the tracheobronchial and mediastinal lymph nodes, the palpation of the lungs, the incision of hepatic and mesenteric lymph nodes and finally, the inspection of the liver and spleen (García-Jiménez et al., 2012). bTB prevalence in each estate was estimated based on the number of animals showing VLTB in the detailed macroscopic inspection, as has been previously described (Parra et al., 2006; Vicente et al., 2007).

Macroscopic bTB lesional patterns were also evaluated. Two different patterns were observed in the studied animals: a generalized pattern (animals with VLTB in more than one organ) and a localized pattern (animals that only showed VLTB in one organ, usually head lymph nodes). The percentage of animals presenting a generalized pattern [calculated as (number of animals with a generalized

Table 1. Prevalences of bTB and PCV-2 found in the estates under study. Wild boar relative densities (hunted individuals/100 ha) and bTB lesional patterns in each estate

Estate	Wild boar relative density	bTB prevalence			Percentage generalized lesional pattern (%)	PCV-2 prevalence		
		Studied animals	Animals with bTB-like lesions	Prevalence (%)		Studied animals	Positive animals	Prevalence (%)
1	25	49	30	61.22	23.33	20	14	70
2	8	11	10	90.9	30	11	6	54.54
3	6.5	11	11	100	18.18	11	11	100
4	25	110	68	61.81	25	20	17	85
5	24	56	44	78.57	45.45	20	15	75
6	26	64	29	45.3	17.24	20	8	40
7	25.5	57	5	8.7	20	20	10	50
8	23	34	1	2.9	0	20	4	20
9	32	45	2	4.4	0	20	0	0
10	13	66	1	1.51	0	20	4	20
11	17	48	33	68.75	0	20	0	0
Total		551	234	47.64		202	89	46.78

pattern/number of animals with TB lesions) \times 100] was estimated in each estate.

Bovine tuberculosis sampling, histopathological and microbiological assessment

To confirm the diagnoses made by visual inspection, intact mandibular lymph nodes and lung tissues from a random selection of animals were recovered in each estate and subject to routine microbiological and histopathological analyses. The number of animals microbiologically and histopathologically studied in each estate is shown in Table 2.

To detect the presence of *Mycobacterium* spp., a microbiological culture from each recovered lymph node was carried out as previously described by García-Jiménez et al. (2012). Suspect colonies were identified as *M. tuberculosis* complex by PCR and 'spoligotyped' following standard methods (García-Jiménez et al., 2012). In addition, to assess the presence of typical tuberculosis granulomas, a piece of mandibular lymph node and lung of each animal sampled were fixed in neutral-buffered formalin (4% formaldehyde) for 7 days and sections of 4 μ m were cut and stained with haematoxylin and eosin for histopathological examination. Sex and age were determined in all sampled wild boar following standard procedures (Risco et al., 2013).

Table 2. Number of animals microbiologically and histopathologically studied in each estate, number of isolates and spoligotype patterns obtained and number of animals with typical TB granulomas

Estate	Studied animals	Percentage of animals studied in each estate (%)	bTB Microbiological culture			Histopathology	
			Positive animals	Negative animals	Spoligotypes obtained	Animals with TB granulomas	Animals without TB granulomas
1	9	18.36	9	0	SB0121, SB1988, SB0295	9	0
2	11	100	10	1	SB1174, SB0121	10	1
3	3	27.27	3	0	SB0152, SB1174, SB0121	3	0
4	5	4.5	4	1	SB0295, SB0119, SB0121	4	1
5	10	17.85	5	5	SB0339, SB0119	4	6
6	4	4.7	1	3	SB0134	1	3
7	5	8.77	2	3	SB1624	2	3
8	11	32.35	1	10	SB1174	1	10
9	6	13.33	1	5	SB0121	1	5
10	7	10.6	2	5	SB0121, SB0134	2	5
11	4	8.3	1	3	SB0119	1	3
Total	75		39	36		40	35

Porcine circovirus type 2 sampling and prevalence assessment

To estimate the PCV-2 prevalence, 20 animals from each estate were randomly selected when possible (when <20 wild boar were hunted, all of them were sampled). Samples from inguinal lymph nodes of wild boar were used to ascertain the presence of PCV-2 infections. DNA from each lymph-node sample was extracted using a commercial QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, RH10 9NQ, UK) following the manufacturers recommendations. After that, a specific PCR was carried out to detect the presence of PCV-2 using previously extracted DNA as a template (Csághola et al., 2006).

Statistical procedures

Relationship between PCV-2 prevalences and bTB prevalences

A set of specific statistical models was evaluated to explore the effect of PCV-2 prevalence (as an explanatory variable) on bTB prevalence. The effect of relative wild boar density was included as a covariate in all statistical models due to the fact that it was quite different in each estate and has been reported to have an effect on the bTB prevalences in wild boar populations (Gortázar et al., 2006). Generalized linear models (GLM) were used (binomial errors and logit link function) to test the effects of PCV-2 prevalence on bTB prevalence. The most parsimonious model was selected following an information-theoretical approach based on the Akaike Information Criterion corrected for small sample sizes (AICc) (Burnham and Anderson, 2003). The Akaike weight (w_i), that is, the relative likelihood of the model given the data available, was also estimated. This statistical procedure was performed using the package 'mgcv', version 1.7-2 of the statistical software R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2012).

Relationship between the percentage of extended lesions and TB prevalences

The percentage of generalized VLTB was also evaluated as a risk factor that would favour high overall bTB prevalences. The statistical procedures previously described were also used for this purpose.

Assessing the effect of PCV-2 infection on bTB lesional pattern

In this analysis, we used the 39 animals that were shown to be infected by *Mycobacterium bovis* among those sampled for microbiological and histopathological assessment of tuberculosis. All of them had a known bTB lesional pattern and a known status of PCV-2 infection. A tree-modelling approach was carried out to assess the relationship between PCV-2 infections and the bTB lesional patterns found.

Classification and regression trees are flexible and robust analytical statistical tools that are ideally suited for the analysis of complex ecological (De'Ath and Fabricius, 2000) and epidemiological data (Friedman and Meulman, 2003). In this case, bTB lesional pattern (i.e. a discrete nominal variable with two categories: 0 = wild boar showing a located lesional pattern and 1 = wild boar showing a generalized lesional pattern) was our response variable and the following factors were proposed as possible explanatory variables: sex (male or female), age (in years) and PCV-2 infection. The resulting tree was fitted on the basis of a cost-complexity measure that maximized the trade-off between the explained deviance with a minimum tree complexity. Finally, the explained deviance for the final tree and predictions for specific values of the response variables were also generated. This statistical procedure was performed using the package 'tree' version 1.0-29 (Ripley, 2011, for fitting tree regression models) of the statistical software R version 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Results

Bovine tuberculosis and PCV-2 prevalence

Prevalences of bTB and PCV-2 found in the estates are summarized in Table 1. The presence of typical tuberculosis granulomas was microscopically assessed in all the studied lymph nodes and lungs with VLTB. No granulomas were microscopically detected in lymph nodes without VLTB. On the other hand, *M. bovis* was isolated from all the studied lymph nodes with VLTB lesions, although this bacterium was also isolated from one animal without VLTB lesions. No other mycobacteria were isolated in the sampled animals. The number of isolates and the spoligotype patterns found in each estate are shown in Table 2.

Relationship between bTB prevalence and PCV-2 prevalence

According to our model selection procedure, the effect of PCV-2 prevalence was enough to explain the observed variability in the bTB prevalence in the estates ($w_{\text{PCV-2 prevalence}} = 0.46$, deviance explained = 34.63%). A competing model including relative wild boar density as an explanatory variable explained a lower percentage of the observed variability in the bTB prevalences ($w_{\text{Relative wild boar density}} = 0.181$, deviance explained = 23.83%). The results of our model selection are summarized in Table 3.

Relationship between TB prevalence and percentage of generalized lesional patterns

When we explored the influence of the percentage of generalized lesional patterns (PGLP) on bTB prevalence, our

Table 3. Model selection to explore the influence of PCV-2 prevalences and of the percentage of animals with generalized lesional patterns (PGLP), on TB prevalences of 11 wild boar game estates in south-western Spain

Biological models	K	AICc	Δ_i	wi
<i>PCV prevalence versus bTB prevalence</i>				
PCV prevalence	2	17.11	0	0.46222
Mo	1	17.81	0.70	0.32538
Relative wild boar density	2	18.98	1.87	0.18106
PCV prevalence + Relative wild boar density	5	22.54	5.43	0.03062
PCV prevalence * Relative wild boar density	4	30.02	12.91	0.00073
<i>Percentage generalized bTB lesional pattern (PGLP) versus bTB prevalence</i>				
PGLP	2	15.97	0	0.35
PGLP * Relative wild boar density	5	16.48	0.51	0.27
Mo	1	17.48	1.51	0.17
Relative wild boar density	2	17.82	1.85	0.14
PGLP * Relative wild boar density	4	19.21	3.24	0.07

Generalized linear models with a binomial error structure have been used. K = number of parameters, including intercept; AICc, Akaike Information Criterion corrected for small sample sizes; Δ AICc = difference of AICc with respect to the best model; wi, Akaike weight; Mo = null model only with the constant term.

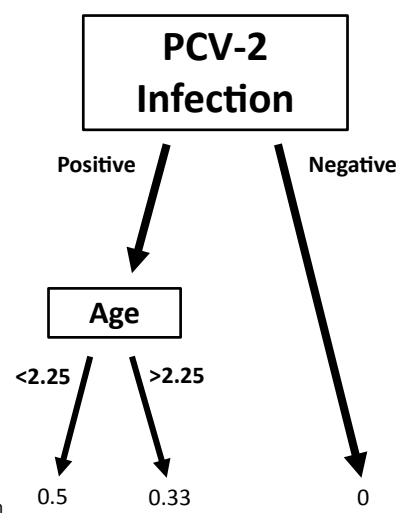
model selection suggested that the effect of this variable is enough to explain the observed variability in bTB prevalence ($w_{PGLP} = 0.35$, deviance explained = 34.43%). As occurred with PCV-2 prevalence, competing models including relative wild boar density as an explanatory variable explained a lower percentage of the observed variability in the bTB prevalences ($w_{Relativewildboardensity} = 0.14$, deviance explained = 22.82%). The results of our model selection are summarized in Table 3.

Relationship between PCV-2 infections and generalized lesional patterns

The most parsimonious tree model was fitted using two variables (PCV-2 infections and age) and explained 14.94% of the probability of having a generalized lesional pattern (Fig. 1). The highest probabilities of showing a generalized lesional pattern (0.5) were found in animals infected by PCV-2 and younger than 2.25 years. Animals infected by PCV-2 and older than 2.25 years showed a lower probability of having a generalized pattern (0.33), whereas all animals uninfected by PCV-2 showed a localized lesional pattern.

Discussion

In this study, a relationship between bTB prevalence and PCV-2 prevalence was found in the wild boar populations



Probabilities of showing a generalized lesional pattern

Fig. 1. Tree-based modelling representing the most important risk factors for explaining the probability of showing a generalized TB lesional pattern in wild boar.

under study, with higher bTB prevalences found in estates where PCV-2 prevalences were high.

Bovine tuberculosis prevalences were estimated based on the number of animals showing VLTB in each estate as previously described (Parra et al., 2006; Vicente et al., 2007). The presence of *Mycobacterium bovis* and typical granulomas was assessed by the random sampling of several animals in each estate, showing that animals with VLTB were truly infected with *M. bovis* and that other mycobacteria were not isolated. Only one animal without VLTB was infected by *Mycobacterium bovis*, showing that advanced lesions are the most typical in these estates, and that visual inspection is a valid tool to estimate TB prevalence.

Porcine circovirus type 2 prevalences seem to be statistically associated with the variability of bTB rates, explaining 34.84% of the deviance. Wild boar density has been associated with high prevalences of bTB. This variable was also included in the model selection. Nevertheless, the models in which this parameter appeared were discarded by the AIC criterion, suggesting a large role for PCV-2 prevalence (deviances explained: 34.84% versus 23.83%) as a risk factor in the populations under study. Population densities were markedly different between the estates under study, with high values not always corresponding with the higher bTB prevalences, suggesting that other factors may modulate their effect on bTB (Table 1).

The interactions between PCV-2 and other pathogens have been widely studied. On the one hand, the presence of other pathogens such as porcine parvovirus (PPV), swine influenza viruses, *Mycoplasma hyopneumoniae* or *Pasteurella multocida* may influence the development of PMWS in swine infected by PCV-2 (Opriessnig et al., 2007). On the

other hand, PCV-2 infections may trigger the development of other processes, as has been reported with exudative epidermitis (Wattrang et al., 2002), or suggested with bTB (Vicente et al., 2004), as our results seem to confirm.

In our study, animals co-infected with *M. bovis* and PCV-2 showed higher probabilities of developing a bTB generalized lesional pattern. The influence of PCV-2 infections in the development of bTB may originate from the effects that PCV-2 has on the immune status of infected animals. Porcine circovirus type 2 may cause lymphocyte depletion, negatively affecting the immune status of animals (Cságola et al., 2006) and favouring a systemic dissemination of *M. bovis*. More research assessing immunological parameters of wild boars will be necessary to clarify this suggestion.

Other factors such as age or sex were also studied as risk factors for the development of generalized lesional patterns. Whereas sex does not seem to be a risk factor, we found that the likelihood of a generalized pattern is higher in animals younger than 2.25 years that are infected with PCV-2. This may be explained by the fact that PCV-2 seems to affect young animals more severely (Segalés et al., 2006). 2.25 years is a significant age in wild boar as it is approximately the age when these animals complete their corporal growth (Rosell, 1998), and thus, animals older than this can dedicate more resources to immunity.

Our results suggest that, in estates with a high percentage of bTB generalized lesional patterns, the bTB prevalences are higher. The presence of generalized patterns may be related to a temporary or permanent inefficiency of cellular immune responses, with poor contention of lesions (Gavier-Widén et al., 2001) favouring bacterial dissemination throughout the wild boar populations and hence the high prevalence rates. The relationship between the presence of generalized patterns and infections with PCV-2 may explain the presence of higher bTB prevalence in estates where the PCV-2 prevalences are high.

To date, measures based on culling, vaccination or management practices been considered for the control of bTB in wild boar (Gortázar et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2012; Boadella et al., 2012); however, the impact of concomitant infections has not been explored. The relationship between the PCV-2 infections and bTB development suggests that sanitary measures focused on the control of this concomitant viral infection may help to reduce the bTB prevalence in affected areas. These should include an investigation of the presence of immunosuppressive situations and, once confirmed, the implementation of corrective measures prior to the use of other bTB control measures that could fail if immunosuppression is present.

Some other factors such as nutritional status or co-infections with other agents might modulate the effect of PCV-2

infections in bTB prevalence. Further research will be carried out to assess the impact of these other parameters.

Conflicts of Interest

The authors declared that they had no conflict of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

References

- Acevedo-Whitehouse, K., J. Vicente, C. Gortázar, U. Höfle, I. G. Fernández-De-Mera, and W. Amos, 2005: Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.* 14, 3209–3217.
- Allepuz, A., J. Casal, S. Napp, M. Saez, A. Alba, M. Vilar, M. Domingo, M. A. González, M. Duran-Ferrer, J. Vicente, J. Álvarez, M. Muñoz, and J. L. Saez, 2011: Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006–2009). *Prev. Vet. Med.* 100, 44–52.
- Beltrán-Beck, B., C. Ballesteros, J. Vicente, J. De La Fuente, and C. Gortázar, 2012: Progress in oral vaccination against tuberculosis in its main wildlife reservoir in Iberia, the Eurasian wild boar. *Vet. Med. Int.* 2012, 1–9.
- Boadella, M., J. Vicente, F. Ruiz-Fons, J. de la Fuente, and C. Gortázar, 2012: Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Prev. Vet. Med.* 107, 214–221.
- Burnham, K. P., and D. R. Anderson, 2003: Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-Theoretic Approach. Springer-Verlag, New York.
- Cságola, A., S. Kecskeméti, G. Kardos, I. Kiss, and T. Tuboly, 2006: Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch. Virol.* 151, 495–507.
- De'Ath, G., and K. E. Fabricius, 2000: Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for ecological data analysis. *Ecology* 81, 3178–3192.
- Fernández-Llario, P., P. Mateos-Quesada, A. Silvério, and P. Santos, 2003: Habitat effects and shooting techniques on two wild boar (*Sus scrofa*) populations in Spain and Portugal. *Z. Jagdwiss.* 49, 120–129.
- Friedman, J. H., and J. J. Meulman, 2003: Multiple additive regression trees with application in epidemiology. *Stat. Med.* 22, 1365–1381.
- García-Jiménez, W. L., J. M. Benítez-Medina, P. Fernández-Llario, J. A. Abecia, A. García-Sánchez, R. Martínez, D. Risco, A. Ortiz-Peláez, F. J. Salguero, N. H. Smith, L. Gómez, and J. Hermoso de Mendoza, 2012: Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 102–109.
- García-Jiménez, W. L., P. Fernández-Llario, J. M. Benítez-Medina, R. Cerrato, J. Cuesta, A. García-Sánchez, P. Gonçalves, R. Martínez, D. Risco, F. J. Salguero, E. Serrano, L. Gómez,

- and J. Hermoso-de-Mendoza, 2013: Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Prev. Vet. Med.* 110, 435–446.
- Gavier-Widén, D., M. A. Chambers, N. Palmer, D. Newell, and R. G. Hewinson, 2001: Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in Eurasian badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Vet. Rec.* 148, 299–304.
- Good, M., T. A. Clegg, A. Duignan, and S. J. More, 2011: Impact of the national full herd depopulation policy on the recurrence of bovine tuberculosis in Irish herds, 2003 to 2005. *Vet. Rec.* 169, 581.
- Gortázar, C., J. Vicente, S. Samper, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Gavín, R. A. Juste, C. Martín, P. Acevedo, M. De La Puente, and U. Höfle, 2005: Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet. Res.* 36, 43–52.
- Gortázar, C., P. Acevedo, F. Ruiz-Fons, and J. Vicente, 2006: Disease risks and overabundance of game species. *Eur. J. Wildl. Res.* 52, 81–87.
- Gortázar, C., J. Vicente, M. Boadella, C. Ballesteros, R. C. Galindo, J. Garrido, A. Aranaz, and J. de la Fuente, 2011: Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet. Microbiol.* 151, 170–178.
- Gortázar, C., R. J. Delahay, R. A. McDonald, M. Boadella, G. J. Wilson, D. Gavier-Widén, and P. Acevedo, 2012: The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mamm. Rev.* 42, 193–206.
- Hermoso de Mendoza, J., A. Parra, A. Tato, J. M. Alonso, J. M. Rey, J. Peña, A. García-Sánchez, J. Larrasa, J. Teixidó, G. Manzano, R. Cerrato, G. Pereira, P. Fernández-Llario, and M. Hermoso de Mendoza, 2006: Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004). *Prev. Vet. Med.* 74, 239–247.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2011: Informe final técnico-financiero programa nacional de la tuberculosis bovina año, 2011.
- Naranjo, V., C. Gortázar, J. Vicente, and J. de la Fuente, 2008: Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127, 1–9.
- Opriessnig, T., X. J. Meng, and P. G. Halbur, 2007: Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591–615.
- Parra, A., P. Fernández-Llario, A. Tato, J. Larrasa, A. García, J. M. Alonso, M. Hermoso De Mendoza, and J. Hermoso De Mendoza, 2003: Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet. Microbiol.* 97, 123–133.
- Parra, A., A. García, N. F. Inglis, A. Tato, J. M. Alonso, M. Hermoso de Mendoza, J. Hermoso de Mendoza, and J. Larrasa, 2006: An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Res. Vet. Sci.* 80, 140–146.
- Risco, D., A. García, E. Serrano, P. Fernández-Llario, J. M. Benítez, R. Martínez, W. L. García, and J. Hermoso de Mendoza, 2013: High-density dependence but low impact on selected reproduction parameters of *Brucella suis* biovar 2 in wild boar hunting estates from south-western Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12060.
- Rodríguez-Prieto, V., B. Martínez-López, J. T. Barasona, P. Acevedo, B. Romero, S. Rodríguez-Campos, C. Gortázar, J. M. Sánchez-Vizcaíno, and J. Vicente, 2012: A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC Vet. Res.* 8, 148.
- Rosell, C., 1998: Biología i ecologia del senglar (*Sus scrofa* L 1758) a dues poblacions del nordeest ibèric. Aplicació a la gestió. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Schiller, I., W. R. Waters, H. M. Vordermeier, T. Jemmi, M. Welsh, N. Keck, A. Whelan, E. Gormley, M. L. Boschirolli, J. L. Moyon, C. Vela, M. Cagiola, B. M. Buddle, M. Palmer, T. Thacker, and B. Oesch, 2011: Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Vet. Microbiol.* 151, 153–159.
- Schulze, C., J. Segalés, G. Neumann, A. Hlinak, M. Calsamiglia, and M. Domingo, 2004: Identification of postweaning multi-systemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* 154, 694–696.
- Segalés, J., G. M. Allan, and M. Domingo, 2006: Porcine circovirus diseases. In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., and Taylor, D. (eds), *Diseases of Swine*, 9th edn, pp. 299–309. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Vicente, J., J. Segalés, U. Höfle, M. Balasch, J. Plana-Durán, M. Domingo, and C. Gortázar, 2004: Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV 2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 35, 243–253.
- Vicente, J., U. Höfle, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, R. Juste, M. Barral, and C. Gortazar, 2006: Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet. Res.* 37, 107–119.
- Vicente, J., U. Höfle, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Acevedo, R. Juste, M. Barral, and C. Gortazar, 2007: Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet. Res.* 38, 451–464.
- Wattrang, E., F. McNeilly, G. M. Allan, C. Greko, C. Fossum, and P. Wallgren, 2002: Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Vet. Microbiol.* 86, 281–293.

4.2 La comunidad de patógenos influye en la gravedad de la tuberculosis en el jabalí. (*Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar*).

Las coinfecciones, es decir, las infecciones simultáneas por varios patógenos en un mismo individuo, están ampliamente extendidas en la naturaleza. Desde un punto de vista ecológico, un hospedador puede ser considerado como un complejo ecosistema en el que determinados parásitos (patógenos) interaccionan entre ellos y con el ambiente (hospedador) para garantizar su existencia (Pérez y cols., 2006). Curiosamente, estas interacciones se pueden dar entre todo tipo de parásitos: macroparásitos (garrapatas, helmintos) y microparásitos (protozoos, bacterias, virus); por lo que las relaciones que se establecen entre los patógenos que infectan un mismo individuo pueden alcanzar una gran complejidad (Yacob y cols., 2006).

Las coinfecciones con otros microorganismos pueden provocar cambios en la dinámica y el desarrollo de algunas enfermedades. Uno de los modelos de interacción más estudiados es el que se produce con infecciones mixtas de helmintos y bacterias. Las infecciones por helmintos generalmente desencadenan una respuesta inmune en la que predomina la producción de citoquinas asociadas a la proliferación de linfocitos Th2, que a su vez, inhiben la producción de citoquinas que favorecen el desarrollo de una respuesta inmune Th1, necesaria para el control de parásitos intracelulares (Graham y cols., 2007). Este antagonismo puede tener consecuencias en el desarrollo de las diferentes poblaciones de patógenos dentro de un mismo hospedador (Supali y cols., 2010). Así, se han descrito ejemplos en los que infecciones bacterianas previas facilitan la colonización del animal por parte de los helmintos, y a su vez, la presencia de helmintos dificulta la lucha frente a las bacterias por parte del animal coinfectado (Pathak y cols., 2012).

Por todo esto, actualmente se asume que las infecciones concomitantes con diversos tipos de patógenos agravan las consecuencias de una infección simple (Steinmann y cols., 2010). Este hecho ha sido descrito en numerosas ocasiones en el caso de la tuberculosis. Desde que a mediados de los años 40 se describiera un grave

caso de tuberculosis pulmonar en un paciente coinfectado con helmintos (Black, 1946), el número de trabajos en los que se han descrito cambios en el desarrollo de la tuberculosis debido a coinfecciones con macro o microparásitos ha crecido año tras año (Li y cols., 2013). No obstante, actualmente, algunos de los más importantes factores de riesgo asociados a la tuberculosis son precisamente la presencia de coinfecciones como la del VIH (Pawlowski y cols., 2012).

La fauna salvaje puede suponer un modelo excelente para estudiar cómo las infecciones concomitantes pueden alterar el desarrollo de enfermedades importantes como la tuberculosis, enfermedad presente en gran cantidad de reservorios silvestres (Bordes y cols., 2011; Gortazar y cols., 2013). El efecto que las coinfecciones producen en el desarrollo de la tuberculosis en estos reservorios ha sido ya probado por ejemplo en el búfalo africano, en el cual se ha demostrado que las coinfecciones con helmintos aumentan la susceptibilidad a padecer tuberculosis y además incrementan la mortalidad producida por esta enfermedad (Jolles y cols., 2008). Sin embargo, existen otros importantes reservorios de tuberculosis en los que esta cuestión ha sido poco estudiada, como el jabalí. En el trabajo anteriormente presentado en esta tesis, se mostraba cómo el desarrollo de la tuberculosis en esta especie se puede ver influido por la presencia de infecciones concomitantes por PCV2, repercutiendo esto, a su vez, en las prevalencias de tuberculosis encontradas en la población. Sin embargo, el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí se podría ver influido por otros patógenos ampliamente distribuidos en las poblaciones de esta especie, como los patógenos respiratorios, entre los que se incluyen parásitos, virus y bacterias. Así, los objetivos principales de este trabajo fueron valorar si la presencia de tuberculosis en el jabalí está asociada a la presencia de otros patógenos y determinar si esos patógenos influyen en el desarrollo de la tuberculosis en esta especie.

El estudio se realizó en 20 fincas repartidas por las zonas centro y oeste de España. Todas estas fincas presentaban un ecosistema mediterráneo típico en el que los jabalíes compartían hábitat con otras especies como el ciervo, el gamo o el corzo. Un total de 165 animales abatidos en diferentes cacerías celebradas en estas fincas fueron analizados. Este análisis incluyó la determinación del sexo y edad de cada

animal y la realización de una necropsia en la que se valoró la presencia de lesiones visibles compatibles con tuberculosis (LVTB) en los principales órganos. Durante la realización de la necropsia se obtuvieron muestras de sangre de cada animal que posteriormente fueron desueradas y su suero utilizado para realizar diagnósticos serológicos.

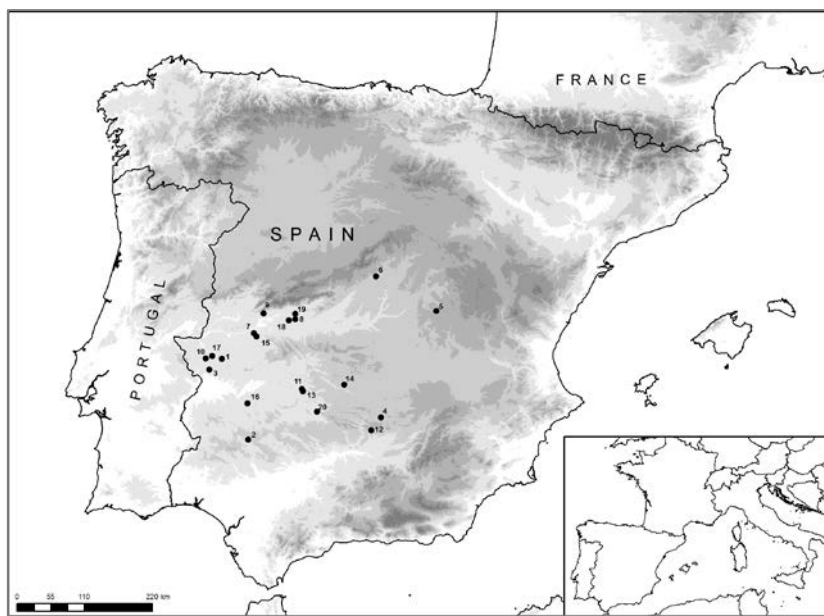


Imagen 20: Distribución por las zonas centro y oestes de España de las 20 fincas incluidas en este estudio

En cada uno de los animales estudiados se realizó un diagnóstico de tuberculosis basado en el aislamiento de *Mycobacterium* spp. Para ello, se llevaron a cabo cultivos microbiológico de material procedente de linfonodos craneales (submandibular y/o retrofaríngeo) y pulmón de cada animal, preferentemente utilizando para el cultivo tejidos con LVTB, en el caso de que existieran. Los aislamientos obtenidos fueron confirmados como pertenecientes al *Mycobacterium tuberculosis Complex* mediante PCR y genotipados mediante *spoligotyping*. Además, en todos los animales se realizó un estudio histológico en el que se incluyeron secciones de pulmón y linfonodo submandibular y/o retrofaríngeo con el objetivo de detectar lesiones microscópicas de tuberculosis. Puesto que la combinación de un diagnóstico microbiológico e histopatológico aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de tuberculosis en jabalí (Santos y cols., 2010), todos aquellos animales que resultaron

positivos al menos a una de estas pruebas, se consideraron como positivos a frente a esta enfermedad.

Una vez realizado el diagnóstico, los animales positivos fueron clasificados en animales con tuberculosis localizada (aquellos que sólo mostraban lesiones tuberculosas en un órgano, generalmente nódulo linfático craneales) o animales con tuberculosis generalizada (aquellos que mostraban lesiones en más de un órgano, generalmente pulmón y linfonodos craneales).

Por otra parte, en cada uno de los animales estudiados se determinó la presencia o el contacto con determinados patógenos respiratorios. Así, la presencia de infecciones activas por *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae* se determinó mediante PCR (Oliveira y cols., 2001; Cho y cols., 2003); mientras que la existencia de un contacto previo con *M. hyopneumoniae*, PRRSV, ADV, SIV y PCV2 se evaluó mediante serología, utilizando kits comerciales (INGEZIM MHYO COMPAC, INGEZIM PRRS EUROPA, INGEZIM ADV TOTAL, INGEZIM INFLUENZA PORCINA, INGEZIM CIRCO IgG, INGENASA, España). Por último, se valoró la presencia de infecciones por *Metastrongylus spp.* en pulmón mediante el contaje directo de estos helmintos (Bush y cols., 1997).

Una vez obtenidos todos los resultados diagnósticos se realizaron una serie de análisis estadísticos. En primer lugar, determinamos si la comunidad de patógenos concomitantes hallada en los jabalíes positivos a tuberculosis era aleatoria, o si por el contrario, existía alguna combinación específica de patógenos. La existencia de combinaciones de patógenos representativas fue valorada en las tres clases de edad (juveniles, subadultos y adultos) mediante la realización de análisis estadísticos basados en una aproximación de “*null models*” usando como indicador de co-ocurrencia el *C-score* (Serrano y cols., 2014).

Además, para evaluar el efecto que los patógenos concomitantes (valorados mediante serología o PCR) sobre el desarrollo lesional de la tuberculosis (localizada o generalizada) usamos una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSr). Este tipo de análisis busca una combinación de variables explicativas que maximice el porcentaje explicado de la varianza observada en la variable respuesta (Haenlein y

cols., 2004). En este trabajo, consideramos una única variable respuesta (patrón lesional de tuberculosis), mientras que la presencia o ausencia de contacto con todos los patógenos concomitantes diagnosticados, la edad y el sexo de los animales, fueron incluidas como posibles variables explicativas.

Tabla 5: Porcentaje de animales positivos frente a los diferentes patógenos valorados en este estudio. Los porcentajes de animales positivos son también mostrados en las diferentes clases de edad.

Patógenos	Porcentaje de animales positivos	Porcentaje de animales positivos por clase de edad
Virus		
PCV	70.9 %	Juveniles: 58.33 % Subadultos: 71.11 % Adultos: 73.96 %
ADV	69.70 %	Juveniles: 45.83 % Subadultos: 55.56 % Adultos: 82.80 %
SIV	24.24 %	Juveniles: 16.67 % Subadultos: 13.33 % Adultos: 31.25 %
PRRSV	0 %	Juveniles: 0 % Subadultos: 0 % Adultos: 0 %
Bacterias		
<i>Mycobacterium bovis</i>	53.93 %	Juveniles: 54.16 % Subadultos: 57.78 % Adultos: 52.08 %
<i>Haemophilus parasuis</i>	0 %	Juveniles: 0 % Subadultos: 0 % Adultos: 0 %
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4.84 %	Juveniles: 0 % Subadultos: 4.44 % Adultos: 6.25 %
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13.94 %	Juveniles: 16.67 % Subadultos: 17.78 % Adultos: 11.46 %
Helmintos		
<i>Metastrongylus spp.</i>	51.51	Juveniles: 66.67 % Subadultos: 57.78 % Adultos: 44.79 %

Mycobacterium bovis fue aislado en 85 animales (51.51 %), de los cuales 28 mostraron infección por este microorganismo tanto en pulmón, como en nódulos linfáticos craneales (patrón generalizado) y 57 individuos sólo en los linfonodos de la cabeza (patrón localizado). Por otro lado, se detectaron lesiones microscópicas compatibles con tuberculosis en 80 linfonodos y 28 pulmones. Nueve de los 85 animales infectados por *M. bovis* no mostraron lesiones microscópicas de tuberculosis mientras que el microorganismo no fue aislado en 4 animales que presentaban granulomas. Por lo tanto 89 animales (53.94 %) fueron considerados positivos a tuberculosis. Dentro de los animales positivos a esta enfermedad a los cuales se les pudo realizar un diagnóstico lesional completo, 28 (40 %) mostraron un patrón lesional generalizado, mientras que 42 (60 %) mostraron un patrón lesional localizado.

El porcentaje de animales positivos frente a cada uno de los patógenos concomitantes valorados en este estudio se muestra en la Tabla 5. Resumidamente podemos decir que se encontraron elevadas seroprevalencias frente a PCV2 (70.90 %) y ADV (69.7 %), mientras que estas fueron menores en los casos de SIV (24.24 %) y *M. hyopneumoniae* (13.94 %). Por su parte, *A. pleuropneumoniae* y *Metastrongylus* spp., fueron detectados en un 4.84 % y un 50.51 % respectivamente mientras que PRRSV y *H. parasuis* no fueron detectados.

Las comunidades de patógenos más frecuentemente encontradas en los animales estudiados se muestran en la Tabla 6. En ella se puede observar como los jabalíes libres de patógenos fueron escasos (5.5 % en adultos) así como los jabalíes que resultaron positivos a todos los patógenos valorados (sólo un individuo). Una de las comunidades de patógenos más frecuentes entre los individuos positivos a tuberculosis, fue la formada por PCV2 y ADV que fue hallada en el 29.6 % de los adultos en el 14.5 % de los subadultos y en el 25.1 % de los juveniles. Los resultados obtenidos en los “*null models*” muestran que las comunidades de patógenos no ocurren por azar, ya que los valores obtenidos en los diferentes *C-score* son mayores que los esperados Tabla 7. Este hecho es especialmente evidente en los adultos donde la diferencia resulta estadísticamente significativa ($p=0.01$).

Tabla 6: Frecuencia observada para cada una de las combinaciones de patógenos obtenidas al valorar *M. bovis*, *Metastrongylus* spp., *M. hyopneumoniae* (Mhyo), PCV2, SIV y ADV en los 165 animales incluidos en este estudio. “0” indica ausencia del patógeno o de anticuerpos específicos mientras que “1” indica que el patógeno está presente o la existencia de anticuerpos específicos frente a él. En negrita todas las combinaciones que aparecen en más de un 5 % de los animales estudiados

<i>Combinación de patógenos</i>						<i>Clase de Edad</i>		
<i>Helmintos</i>	<i>Bacterias</i>		<i>Virus</i>			<i>Porcentaje</i>		
<i>Metastrongylus</i> spp	<i>M. bovis</i>	<i>Mhyo</i>	PCV2	SIV	ADV	Adults	Yearlings	Juveniles
0	1	0	1	0	1	11.2 %	3.6 %	4.2 %
1	1	0	1	0	1	9.2 %	9.1 %	16.7 %
1	1	0	1	1	1	9.2 %	1.8 %	4.2 %
0	0	0	1	0	1	9.2 %	7.3 %	0 %
1	0	0	1	0	1	8.2 %	7.3 %	8.3 %
1	1	0	1	0	0	2 %	9.1 %	8.3 %
0	0	0	1	0	0	3.1 %	7.3 %	4.2 %
0	1	0	1	0	0	3.1 %	7.3 %	4.2 %
0	0	1	1	0	0	0 %	7.3 %	0 %
0	0	0	0	0	0	2 %	5.5 %	4.2 %
1	0	0	0	0	1	2 %	5.5 %	4.2 %
0	0	0	1	0	0	3.1 %	7.3 %	4.2 %
1	1	1	1	1	1	1 %	0 %	0 %

Tabla 7: C-score observado (O) y esperado (E) para la matriz de combinación de patógenos obtenida para los animales incluidos en este estudio pertenecientes a diferentes clases de edad.

<i>Clase de Edad</i>	<i>C-score</i>			
	O	E	p	SES
Juveniles	4.46	4.19	0.15	1.14
Subadultos	19.31	18.70	0.78	0.68
Adultos	39.93	36.11	0.01	2.71

En el modelo obtenido tras el análisis PLSr, la presencia de anticuerpos frente a PCV2, SIV y ADV, las infecciones con *Metastrongylus* spp. y la edad fueron incluidas

como variables explicativas en el primer factor propuesto. Con él se explica un 23.94 % de la variabilidad de nuestra variable respuesta (patrón lesional de tuberculosis). Más del 95 % de la variabilidad explicada por este factor se debió a la presencia de anticuerpos específicos frente a PCV2 y ADV, la presencia de *Metastrongylus* spp. (correlación positiva) y la edad de los animales (correlación negativa) (Tabla 8).

Tabla 8: Pesos predictivos y porcentaje de la varianza explicados por cada uno de los patógenos incluidos en el modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales. El peso predictivo indica la aportación de cada uno de los patógenos al primer componente estadístico obtenido (23.94 % de la varianza explicada).

Patógenos	Peso predictivo	% Varianza explicada
PCV2	0.574	33.2
<i>Metastrongylus</i> spp	0.554	30.9
ADV	0.442	19.6
Age	-0.345	11.9
Sex	0.162	2.7
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	- 0.132	1.7
SIV	-0.01	0

Así, los resultados obtenidos en el análisis sugieren que los animales jóvenes seropositivos a PCV2 y ADV e infectados por *Metastrongylus* spp. tienen más probabilidades de presentar un patrón lesional generalizado y, por lo tanto, un cuadro más grave de tuberculosis. Esto muestra que las interacciones entre patógenos en un mismo hospedador pueden ser complejas, viéndose involucrados diferentes tipos de patógenos, lo que enfatiza la importancia de valorar una amplia gama de patógenos para esclarecer las consecuencias que tienen las coinfecciones en un hospedador.

La relación entre estos patógenos y el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí podría estar provocada por la modulación de la respuesta inmune que se produce en las infecciones múltiples (Graham y cols., 2007). Concretamente, la respuesta inmune frente a *Mycobacterium* spp. está mediada por linfocitos Th1 y la presencia de citoquinas como el gamma-Interferón (γ -IFN), la interleucina 12 (IL12) o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Salgame, 2005). Esta respuesta inmune Th1 podría ser inhibida por la presencia de estos patógenos concomitantes (PCV2, ADV y *Metastongylus* spp.) (Kamal y cols., 2006; Pejsak y cols., 2006; Kekarainen y cols.,

2008). Sin embargo, serán necesarias más investigaciones para establecer el efecto de estos patógenos en el sistema inmune del jabalí.

Los resultados obtenidos en nuestro PLSr indican que utilizando la edad y el contacto con PCV2, ADV y la presencia de *Metastrongylus* spp. como variables explicativas podemos explicar casi un 25 % de las posibilidades de que un jabalí presente una forma de tuberculosis generalizada. Pese a que este porcentaje de varianza explicada puede considerarse como bastante adecuado (porcentajes entre el 14 % y el 25 % son los más comúnmente obtenidos en estudios ecológicos (Moller y cols., 2002)), otros factores no incluidos en este estudio como la presencia de nematodos intestinales o factores genéticos, podrían afectar al desarrollo de esta enfermedad. Por lo tanto, su inclusión en próximos estudios podría completar los resultados obtenidos.

Con respecto al tiempo y al orden en el que se producen las infecciones con los patógenos valorados, debemos considerar que el presente estudio no nos permite precisar si el contacto con los diferentes patógenos, fue anterior, simultaneo o posterior al momento en el que se produce la infección con *Mycobacterium bovis*. En cualquier caso, este hecho no supondría una limitación ya que se ha comprobado que otros agentes pueden afectar el desarrollo de la tuberculosis en ambos casos: tanto si el individuo estaba previamente infectado por *Mycobacterium* spp. (reactivando la infección) (Diedrich y cols., 2011); como si el individuo adquirió la infección con *Mycobacterium* spp. posteriormente (facilitando el desarrollo y la expansión de las lesiones) (Elias y cols., 2005b).

Por otra parte, el diagnóstico de varios de los agentes valorados en este estudio se basó en la detección de anticuerpos específicos frente a ellos. La detección de altos niveles de anticuerpos indica que el individuo ha estado en contacto con el patógeno, pero no necesariamente que se encuentre actualmente infectado. Sin embargo, esta limitación podría no influir en los resultados obtenidos, ya que la tuberculosis es una enfermedad crónica en la que las lesiones pueden persistir en el individuo afectado durante un largo tiempo (Bollo y cols., 2000). Por lo tanto, los análisis serológicos nos

permiten explorar el posible efectos de coinfecciones, tanto pasadas como presentes, en la gravedad de la tuberculosis valorada según la distribución lesional hallada en el momento del muestreo.

La presencia de animales con cuadros generalizados de tuberculosis ha sido relacionada con altas prevalencias de esta enfermedad en poblaciones de jabalíes (Risco y cols., 2013a). Por este motivo, la aplicación de medidas encaminadas a luchar contra los patógenos que favorecen la presencia de este tipo de cuadros (vacunación, desparasitación), podría ser útil en la lucha global frente a la tuberculosis en este animal.

Además, la presencia de estos patógenos concomitantes podría comprometer el éxito de algunas de las medidas de control propuestas para la lucha contra la tuberculosis en el jabalí, como es la vacunación. Por ejemplo, se ha demostrado en diferentes especies animales que esta medida no funciona en animales parasitados, cuya respuesta inmune está sesgada hacia Th2 (Elias y cols., 2005a).

Sin embargo, las experiencias realizadas con este tipo de medidas, encaminadas a la lucha frente a patógenos concomitantes, han sido contradictorios hasta el momento, por lo que su utilización en la lucha frente a la tuberculosis en el jabalí debería estudiarse bajo condiciones controladas para valorar rigurosamente sus resultados.

Por otra parte, sería importante tener en cuenta que el efecto de los patógenos concomitantes en el desarrollo de una enfermedad concreta es mayor en épocas de escaso alimento (Ezenwa y cols., 2011). Por lo tanto, la utilización de medidas encaminadas a mantener una buena condición corporal en estos animales como la administración de un alimento suplementario de calidad, podría ayudar a paliar los efectos de estos patógenos y por lo tanto ser efectiva en la lucha global contra la tuberculosis. Esta medida podría ser sólo recomendable en fincas cerradas, ya que la suplementación en áreas naturales podría favorecer la agregación de la fauna salvaje en torno a los puntos de suministro de comida e incrementar el riesgo de transmisión de la tuberculosis.

PLOS ONE

Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-13-50570R1
Article Type:	Research article
Full Title:	Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar
Short Title:	Pathogen community drives tuberculosis wild boar
Corresponding Author:	David Risco, DVM Universidad de Extremadura Cáceres, Cáceres SPAIN
Keywords:	Multiple infections, Mycobacterium bovis, Null models, Porcine circovirus type 2, Partial Least Squares regression (PLSr), Sus scrofa
Abstract:	Co-infections with parasites or viruses drive tuberculosis dynamics in humans, but little is known about their effects in other non-human hosts. This work aims to investigate the relationship between Mycobacterium spp infection and other pathogens in wild boar (<i>Sus scrofa</i>), a recognized reservoir of bovine tuberculosis (bTB) in Mediterranean ecosystems. More specifically, in this work we assessed the role of common concomitant infections in the severity of tuberculosis in 165 wild boar from mid-western Spain. The presence of tuberculosis lesions affecting only one anatomic location (cervical lymph nodes), or more severe patterns affecting more than one location (mainly cervical lymph nodes and lungs), was also assessed in infected animals. In addition, the existence of contacts with other pathogens such as porcine circovirus type 2 (PCV2), Aujeszky's disease virus (ADV), swine influenza virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Haemophilus parasuis</i> and <i>Metastrongylus</i> spp, was assessed by means of serological, microbiological and parasitological techniques. The existence of a structured community of concomitant infections in wild boar infected with <i>Mycobacterium bovis</i> was statistically investigated by null models. Whether the contact with other pathogens drives disease severity was examined using a Partial Least Squares regression approach. Results showed that adults infected by <i>Mycobacterium bovis</i> had contacted with some specific, non-random pathogen combinations. Previous contact with PCV2, ADV and infection by <i>Metastrongylus</i> spp, enhanced tuberculosis severity. Since the presence of specific pathogen communities seems to alter the development of tuberculosis, measures against these concomitant pathogens such as vaccination or deworming, might be useful in tuberculosis control programmes in the wild boar. However, given the unexpected consequences of altering any community of organisms, further research should evaluate the impact of such measures under controlled conditions.
Order of Authors:	David Risco, DVM Emmanuel Serrano Pedro Fernández-Llario Jesús María Cuesta Pila Gonçalves Waldo Luis García-Jiménez Remigio Martínez Rosario Cerrato Roser Velarde Luis Gómez Joaquím Segalés Javier Hermoso de Mendoza

Title

Pathogen community drives bovine tuberculosis severity in the European wild boar

Authors

D. Risco¹, E. Serrano ^{2,3}, P. Fernández-Llario¹, J. M. Cuesta¹, P. Gonçalves¹, W. L. García-Jiménez¹, R. Martínez¹, R. Cerrato¹, R. Velarde ², L. Gómez¹, J. Segalés ^{4,5}, J. Hermoso de Mendoza¹

Affiliations

¹ Red de Grupos de Investigación en Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain.

² Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

³ CESAM, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

⁴ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

⁵Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

Corresponding author: David Risco. Red de Grupos de Investigación Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, E-10003 Cáceres, Spain. Phone: 34 927 257114, Fax: 34 927 257110, e-mail address: driscope@gmail.com

Abstract

Co-infections with parasites or viruses drive tuberculosis dynamics in humans, but little is known about their effects in other non-human hosts. This work aims to investigate the relationship between *Mycobacterium* spp infection and other pathogens in wild boar (*Sus scrofa*), a recognized reservoir of bovine tuberculosis (bTB) in Mediterranean ecosystems. More specifically, in this work we assessed the role of common concomitant infections in the severity of tuberculosis in 165 wild boar from mid-western Spain. The presence of tuberculosis lesions affecting only one anatomic location (cervical lymph nodes), or more severe patterns affecting more than one location (mainly cervical lymph nodes and lungs), was also assessed in infected animals. In addition, the existence of contacts with other pathogens such as porcine circovirus type 2 (PCV2), Aujeszky's disease virus (ADV), swine influenza virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Metastrongylus* spp, was assessed by means of serological, microbiological and parasitological techniques. The existence of a structured community of concomitant infections in wild boar infected with *Mycobacterium bovis* was statistically investigated by null models. Whether the contact with other pathogens drives disease severity was examined using a Partial Least Squares regression approach. Results showed that adults infected by *Mycobacterium bovis* had contacted with some specific, non-random pathogen combinations. Previous contact with PCV2, ADV and infection by *Metastrongylus* spp, enhanced tuberculosis severity. Since the presence of specific pathogen communities seems to alter the development of tuberculosis, measures against these concomitant pathogens such as vaccination or deworming, might be useful in tuberculosis control programmes in the wild boar. However, given the unexpected consequences of altering any community of organisms, further research should evaluate the impact of such measures under controlled conditions.

Key words: Multiple infections, *Mycobacterium bovis*, Null models, Porcine circovirus type 2, Partial Least Squares regression (PLSr), *Sus scrofa*

Introduction

Co-infections (i.e., the simultaneous infection of a host by two or more pathogens) are ubiquitous in nature but most research on relevant diseases largely relies on a “one-disease-one-pathogen” perspective. From the point of view of community ecology, a host can be considered a complex ecosystem composed of parasites that directly or indirectly interact among themselves and with their own environment, the host [1]. This holistic perspective considers co-infections as specific cases of competition [2] that regulate parasite populations within the host, either protecting (see Reich et al. 2013 for a case of cross-immunity [3]) or driving infection risk [4]. Interestingly, such interactions are possible between microparasites (virus, bacteria, fungi or protozoa) and macroparasites (helminths and arthropods) inhabiting different organs (i.e., arthropods infecting nasal cavities drives gastrointestinal nematode fitness [5]), and thus predicting the outcome of co-infection is a complex task.

Among all possible interactions, bacteria-helminth co-infections are one of the most studied models for exploring how co-infection drives disease dynamics and severity. Helminths mostly induce cytokines associated with a T-helper cell type 2 (Th2) immune response, which simultaneously down-regulates T-helper cell type 1 (Th1) cytokines involved in intracellular microparasite control [6]. The consequences of this antagonism in immune mechanisms, in terms of changes in dynamics of bacteria or helminth populations, are difficult to predict [7]. A well-known example of this complexity is the bacteria-helminth co-infections in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). In this host-parasite model, respiratory infection by *Bordetella bronchiseptica* facilitates secondary helminth (*Graphidium strigosum*) infections that, at the same time, collaborate in maintaining the bacterial persistence in the upper respiratory tract [8]. *B. bronchiseptica* infection does not only facilitate *Heligmosomoides polygyrus* reproduction, another

gastrointestinal nematode [9], but also accelerates the expulsion of a third worm species (*Trichostrongylus retortaeformis*) from the small intestine [10].

Shifts in disease severity are also common in a broad range of co-infected hosts. Concomitant infections often exacerbate the effects of single infections, independently of the diversity in parasite groups involved in the infection process. For example, tuberculosis (caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex) susceptibility and severity are shaped by co-infection with different types of pathogens. Since the first report describing severe pulmonary *Mycobacterium* spp-helminth co-infected patients in the mid 1940's [11], the number of works describing changes in tuberculosis pathology due to micro- or macroparasite co-infection has grown year after year [12]. Viruses also seem to shape tuberculosis dynamics, and HIV-*Mycobacterium* spp co-infection in humans is one of the best known examples. In fact, the HIV infection is considered one of the main risk factors predisposing patients to tuberculosis and progression to active disease, increasing the risk of latent tuberculosis reactivation 20-fold [13].

Wildlife is an excellent model for exploring whether co-infection drives infectiousness of major diseases since they are almost always co-infected by several pathogens [14]. Bovine tuberculosis (bTB) due to *Mycobacterium bovis* is one of them and it is present in a broad range of wild hosts across different geographic regions [15]. Cervids in North America, badgers (*Meles meles*) in Great Britain, brush tailed possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand, buffalo (*Syncerus cafer*) in South Africa and wild boar (*Sus scrofa*) in the Iberian Peninsula are common reservoirs of this infectious disease [16]. The effects of co-infection have been described in those wild models. In the African buffalo, for example, nematode infection is likely not only to increase bTB susceptibility [17], but also accelerate mortality due to body condition impairment in co-infected individuals [18]. A positive relationship between porcine circovirus type 2 (PCV2) and bTB prevalences has also recently been observed in wild boar populations from mid-western

Spain [19]; however little is known about the role of other common pathogens in wild boar in tuberculosis dynamics.

The aim of this work was to assess the role of common respiratory pathogens in bTB severity in wild boar from mid-western Spain. Evidence of infection by means of serology and/or pathogen detection was carried out for viruses (PCV2, Aujeszky's disease virus [ADV], porcine reproductive and respiratory syndrome virus [PRRSV] and swine influenza virus [SIV]), bacteria (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*) and a nematode (*Metastrongylus* spp) in 165 wild boar from mid-western Spain. Two hypotheses were tested. The first investigated whether contact with a respiratory pathogen in *Mycobacterium* spp infected wild boar occurred by chance or, on the contrary, was due to a structure community of pathogens (hypothesis *i*). The second was supported by links between tuberculosis severity and concomitant viral and nematode infections observed in both human [12,13,20] and animal hosts [18] and explored whether disease severity in wild boar is driven by particular pathogen assemblages (hypothesis *ii*).

Materials and Methods

Ethics Statement

Animals included in this study belonged to private estates and were studied and sampled with the permission of their respective game managers after being hunted in commercial or sportive game activities. Since this study was carried out in private lands, no specific permissions or government approval, were required. Wild boar were hunted during game activities called "monterias" that took place according to legal guidelines. Thus, the animals were not killed specifically for this study. The development of this study did not involve any endangered or protected species in the studied area (mid-western Spain). This study did not need to be approved by any animal ethics

committee since animals were not killed for scientific purposes.

Study site

This study was carried out on 20 wild boar game estates in mid-western Spain (Figure 1). In this area the average annual precipitation reaches 623 mm and is concentrated from November to April. The mean annual temperature averages 17.7°C, January being the coldest and July the warmest months of the year. The vegetation is typical of Mediterranean forest, characterized by abundant *Quercus ilex* and *Q. suber* trees with understories dominated by *Q. coccifera*, *Cistus ladanifer* and *Erica arborea*. Wild boar density in the studied area ranged between 6.5 and 30 wild boar / hectare [21]. In all game estates included in this work, wild boar shared habitat with red deer (*Cervus elaphus*) and, in some cases, with fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*) or extensive herds of cattle.

Sampling procedures

A total of 165 hunter harvested wild boar were collected between October 2011 and February 2013. The sex and age of these animals were determined on the basis of the observation of their sexual organs and the eruption of dentition pattern, respectively [22]. Necropsy examination of all animals was performed in the field with detailed macroscopic inspection, in order to assess the presence of bTB-like visible lesions affecting lymph nodes (submandibular, retropharyngeal, mediastinal and mesenteric lymph nodes), and thoracic and abdominal organs. Submandibular and/or retropharyngeal lymph nodes, lungs and blood samples collected from the heart or thoracic cavity, were recovered and stored at 4°C until they were processed within the following 24 hours. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and extracted serum was stored at -20°C until analysis.

bTB diagnosis

Diagnosis of bTB in wild boar was carried out based on the isolation of *M. bovis* as well as on the presence of microscopic granulomatous bTB lesions. Since the combination of microbiological culture and histopathology increases the sensitivity and specificity of bTB wild boar surveys [23], animals that were positive for both, or at least according to one of these diagnostic techniques, were considered to be positive for bTB.

To detect the presence of *M. bovis*, a microbiological culture from intact (not handled or cut) submandibular or retropharyngeal lymph nodes and from a piece of caudal lung lobes (both with gross bTB-like lesions when possible) of each animal was carried out. For bacterial culture, tissue samples were sectioned and dissected, trimming the fat and connective tissue, using sterile scissors and forceps for each individual sample. Two grams of tissue were homogenized in 10 ml of sterile water with 0.2% albumin (Albumin from bovine serum Sigma, St Louis, MO, USA) for 4 min in a mechanic homogenizer (Smasher; AES Laboratories, Montreal, QC, Canada). The homogenized material was then decontaminated by the hexadecyl pyridinium chloride method [24]. Finally, two Lowenstein–Jensen slants, with pyruvate and without glycerol, were inoculated in parallel and incubated for 6–8 weeks. Suspicious colonies obtained in microbiological cultures were identified as *M. tuberculosis* complex by PCR and “Spoligotyped” following standard methods [25,26], allowing their identification as *M. bovis*.

In addition, to assess the presence of tuberculosis granulomas, a piece of submandibular or retropharyngeal lymph node and lung of each animal sampled were fixed by immersion in neutral, buffered-formalin (4% formaldehyde) and sections of 4 µm were cut and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. The tissue pieces used for the histopathological analysis were chosen based on the presence of macroscopic bTB-like lesions when present. For

wild boar in which bTB-like lesions were not found, a piece of submandibular lymph node and caudal lung lobe were identically processed for histopathology.

bTB severity assessment

To consider the extent of bTB, wild boar were classified into two groups: animals with a localized lesion pattern and animals with a generalized lesion pattern. Based on the distribution of lesions, generalized bTB implies more severe disease and a greater bacterial load than localized bTB [27].

Animals showing a localized pattern were those with bTB lesions in one location, mainly submandibular or retropharyngeal lymph nodes (Figure 2a). On the other hand, those wild boar with lesions in these lymph nodes and any other organ, e.g. lung, liver, mesenteric lymph nodes and/or spleen, were considered to have a generalized pattern (Figure 2b). Since lung is the most common organ in which secondary bTB lesions can be found in wild boar [28], lung tissue was chosen to carry out a systematic detection (through microbiological culture and microscopic examination) of generalized bTB.

A complete lesion assessment could not be carried out in 25 of 165 animals included in this study, since these animals were partially eviscerated upon arrival at the inspection area. This meant we could not ensure the lack of bTB-like lesions in abdominal organs and, therefore, their lesion pattern could not be completely determined.

Bacterial pathogen/antibody detection

The presence of concomitant bacterial respiratory pathogens, such as *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, was determined in lungs of the sampled animals. DNA from a piece of cranial lobe from one of the lungs was extracted using a commercial QIAamp®

DNA Mini kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, RH10 9NQ, United Kingdom) following the manufacturer's recommendations. Later, specific PCRs were carried out in order to detect the presence of *H. Parasuis* [29] and *A. Pleuropneumoniae* [30] using previously extracted DNA. Antibodies against *M. hyopneumoniae* were detected using a commercial blocking-ELISA assay (INGEZIM M. HYO COMPAC®, Ingenasa, Madrid, Spain) that was carried out using duplicate serum samples from each animal, exactly following the protocol suggested by the manufacturer (amount of reagent, incubation time, cut-off used).

Viral pathogen antibody detection

Concerning viruses, a serologic survey for previous contacts with viral pathogens was carried out using commercial ELISA kits and following all the manufacturer's recommendations as well. The presence of antibodies against PCV2 (INGEZIM CIRCO IgG®), ADV (INGEZIM ADV TOTAL®), SIV (INGEZIM INFLUENZA PORCINA®) and PRRSV (INGEZIM PRRS EUROPA®) was evaluated using duplicate samples of sera obtained from blood samples.

Metastrongylus spp detection

Pulmonary nematodes were collected by lung dissection. During examination, the trachea and main bronchi were opened longitudinally with scissors, carefully examined and then placed under running water to collect adult worms on a sieve. In addition, the pulmonary parenchyma – and in particular the affected areas – were dissected carefully under a dissecting microscope to extract adult nematodes. Permanent preparations of adult specimens were made with lactophenol cotton blue solution and genus identification was based on previous descriptions [31]. The total number of adult worms collected from an individual [32] was used as a proxy for parasitic load.

A brief summary of the techniques used for antibodies and pathogen detection and the clinical picture produced by bacteria, viruses and parasites assessed in this work are shown in Table 1.

Statistical Procedures

For the analyses described below, all estates showed the presence of the most prevalent pathogens, e.g., *M. bovis*, PCV2, ADV, SIV and *Metastrongylus* spp. Neither differences in pathogen prevalences, pathogen community structure nor in the effects of co-infection on bTB severity were determined at the game estate scale, in part because the sample size never exceeded 30 individuals per estate.

Pathogen community

Whether or not contact with other pathogens in wild boar infected by *Mycobacterium* spp occurred by chance was studied using the null model analysis. Data were organised as presence/absence matrices in which each row represented a pathogen species and each column represented an individual wild boar. In a presence/absence matrix, “1” indicates that a species is present at a particular site or host, and “0” indicates that a species is absent [33]. A total of three matrices were created separately for each age class: juveniles (6–12 months), yearlings (13–24 months) and adults (over 24 months).

The C-score was used as a co-occurrence index for exploring co-occurrence patterns [34] and the FE algorithm (fixed row-equiprobable column) chosen for analysing obtained results. The C-score measures the average number of checkerboard units between all possible pairs of species. In a competitively structured community, the observed C-score should be significantly larger than expected by chance ($O > E$); such a community would tend to show negative co-occurrence and would be segregated. Otherwise, a C-score smaller than expected by chance ($O < E$) indicates

positive co-occurrence, and thus species in that community would tend to be aggregated [35]. The C-score has been used in diverse null models as a powerful tool to measure not only parasite assemblages [36], but also viral co-infections in pigs [37]. The observed C-score was calculated for each presence/absence matrix and compared with the expected C-score calculated for 5000 randomly assembled null matrices by Monte Carlo procedures. The analysis was carried out using the software EcoSim 7.72 [38].

In addition, to compare the degree of co-occurrence across data, a standardised effect size (SES) for each matrix was calculated. The SES measures the number of standard deviations that the observed index (C-score) is above or below the mean index of the simulated communities.

The role of co-infection in bTB severity

The effects of viruses, bacteria and nematode species (by means of direct detection or serological evidence of infection) on bTB severity (0 for wild boar showing bTB-like lesions only in submandibular/retropharyngeal lymph nodes, and 1 for those showing bTB-like lesions in both lymph nodes and lungs) was assessed by a Partial Least Squares regression approach (PLSr). This statistical tool is an extension of multiple regression analysis, where associations between groups of variables are established with factors, i.e., combinations of dependent variables extracted from predictor variables that maximise the explained variance in the dependent variables. PLSr is probably the least restrictive of the multivariate techniques [39]. This flexibility allows its use when there are fewer observations than predictor variables or in the case of multicollinearity [40]. Moreover, PLSr allows the study of covariance in both explanatory and predictor variable groups [41].

In the present study, bTB severity was considered as a single explanatory variable, while concomitant pathogens represented the X predictor factor. For PLSr modelling, the age of

animals was considered in months. The “plspr” library version 0.3.7 [42] of the R software version 3.0.3[43] was used for these analyses.

Results

Percentage of animals positive against selected pathogens

The *M. bovis* isolates were obtained from 85 animals (51.51 %). Within infected animals, 28 showed *M. bovis* infection in both submandibular/retropharyngeal lymph nodes and lungs (generalized pattern), whereas 57 only showed *M. bovis* infection in submandibular/retropharyngeal lymph nodes (localized pattern). On the other hand, bTB-like microscopic lesions were observed in 80 submandibular/retropharyngeal lymph nodes (48.48%, n= 165 lymph nodes) and 28 lungs (16.96%, n=165 lungs). Nine out of 85 animals infected by *M. bovis* (10.58%) did not show evidence of microscopic bTB-like lesions, while this microorganism could not be isolated from four animals that showed typical bTB granulomatous lesions in their lymph nodes (5%). Thus, since the combination of microbiological culture and histopathology increases the sensitivity of bTB diagnosis in wild boar [23], these 89 animals were considered positive to bTB (53.94%). All the isolates obtained were identified as *M. bovis* and showed 12 different spoligotype patterns (SB0119 (15.29%), SB0121 (25.88%), SB0134 (4.71%), SB0296 (3.53%), SB0339 (23.53%), SB1091 (8.23%), SB1142 (8.23%), SB0120 (1.18%), SB0152 (3.53%), SB0848 (3.53%), SB1142 (8.23%), SB1174 (2.35%)).

A detailed lesion severity assessment was carried out in 71 out of 89 animals positive to bTB. Generalized lesion patterns were detected in 28 bTB affected animals (40%), whereas localized lesions were observed in 43 affected animals (60%). Some of the animals with generalized patterns also displayed gross bTB-like lesions in organs such as liver, spleen or mesenteric lymph nodes; however, no bTB-like lesions were found in these organs in animals that did not

show bTB-like lesions in the lungs.

The percentage of animals positive for selected respiratory pathogens is shown in Table 2. High rates of seropositive animals were found against PCV2 (70.9%) and ADV (69.7%), while lower percentages were found against other pathogens such as SIV (24.24%) and *M. hyopneumoniae* (13.94%). *A. pleuropneumoniae* and *Metastrongylus* spp were detected in 4.84 % and 50.51% of the animals, respectively, whereas evidence of infections with PRRSV or *H. parasuis* was not detected.

Pathogen community structure

The most common helminth, bacteria and virus assemblages observed in *Mycobacterium bovis* infected juvenile, yearling and adult wild boar are shown in Table 3. Pathogen-free wild boar were rare (5.5% of cases) as were wild boar infected with bTB and all the other pathogens studied (just one individual, Table 2). The 29.6% of adults, 14.5% of yearlings and 25.1% of juveniles that were *Mycobacterium bovis* infected showed antibodies against PCV2 and ADV.

The null model analysis showed that the observed C-scores were smaller than expected by chance ($O < E$) indicating that the pathogen community was aggregated; that is, bTB-infected wild boar were co-infected by some specific, non-random pathogen combinations (Table 4). This fact was especially evident for adult animals, which showed the only statistically significant result (Table 4).

Effects of co-infection on bTB severity

In the PLSr analysis, presence of PCV2, SIV and ADV antibodies, *Metastrongylus* spp, sex and age provided a significant first PLSr X's component explaining 23.94% of the observed variability (Table 5). More than 95% of the total variance explained by the PLSr X axis was due not only to

virus exposure (PCV2 and ADV) but also to age of animals and infection by lung nematodes. The weights of variables performing the explanatory X's component describing the severity of bTB infection had different signs. A positive relationship of bTB infection severity was found with evidence of PCV2 and ADV contact and presence of *Metastrongylus* spp, whereas a negative influence was related to age (Figure 3). This pattern suggests that PCV2 and ADV seroconversion and *Metastrongylus* spp infection in young boar resulted in a higher likelihood for severe bTB. Finally, the sex of animals, *Mycoplasma hyopneumoniae*, and SIV infection appeared to have no influence on tuberculosis severity.

Discussion

Results obtained in this work suggest that evidence of infection with common respiratory pathogens such as PCV2, *Metastrongylus* spp and ADV imply a higher likelihood of developing generalized bTB lesions in wild boar. This fact has already been observed in animal models co-infected by two pathogens [17,44]. However, to date no work has evaluated the role of a more complex pathogen community on the cost of suffering from tuberculosis. This emphasizes the importance of considering a broad representation of the pathogen community to obtain a clear picture of the consequences of these multiple infections [45]. As seen in our study, in adult wild boar a contact with a specific pathogen community favours the development of a generalized pattern of tuberculosis.

The mechanism driving the effect of concomitant pathogens on the ability of wild boar to deal with bTB might be related to an impaired immune response in the face of multiple infections [6]. Specifically, the immune response against *Mycobacterium* spp is mainly mediated by T-helper cells type 1 (Th1) and cytokines such as gamma interferon (IFN- γ), interleukin (IL)-12 and tumour necrosis factor (TNF) [46]. In this sense, as shown by different studies [47-49], pathogens that

seem to drive bTB in wild boar (PCV2, ADV and *Metastrongylus* spp) may down-regulate the Th1 immune response of the host. Therefore, infections with these pathogens may impair the development of an effective immune response against *M. bovis* in wild boar, although more research assessing immunological parameters is necessary to confirm this hypothesis.

Our PLSr modelling including “age” and “contact with PCV2, ADV or *Metastrongylus* spp” as risk factors explained almost 25% of the likelihood of showing generalized bTB lesion patterns in wild boar. Although the percentage of explained variance of the observed variability in bTB disease severity can be considered adequate (note that r between 0.14 to 0.25 are the most common effect sizes in observational ecological works [50]), other factors not included in this study (e.g., infections with intestinal nematodes or host genetics [17,51]) might also play an important role in the development of this disease. Therefore, future studies taking into account these factors might complete the results obtained in the present work.

Regarding the order and timing of infections, the current study does not allow the determination of whether contact with these other pathogens was prior, concomitant or posterior to the precise infection timing with *M. bovis* in the studied animals. However, co-infection with other pathogens may affect the development of tuberculosis in all cases, by reactivating the infection in animals previously infected with *Mycobacterium* spp. [52] or by allowing a more rapid expansion of the lesions (increasing the severity) in animals that were infected with *Mycobacterium* spp. later [53].

Diagnosis of some of the pathogens assessed in this work was based on serological techniques. Detection of antibodies against one pathogen does not necessarily mean a current infection since high titers of antibodies may remain for a long time after the clearance of the agent. However, this limitation might not influence the results obtained in this study since tuberculosis is a chronic disease and lesions may persist in an affected wild boar for a long time [54]. Thus, serological analyses allow the exploration of the possible effects of past or current co-infections on the

severity of bTB, defined by the detection of a generalized pattern of lesions at the moment of sampling.

According to obtained results, certain pathogen combinations seem to enhance the severity, and probably the rate of transmission of bTB in wild boar [27]. Since the presence of animals displaying severe bTB lesion patterns has been recently related to higher bTB prevalence in wild boar populations [19], programs aimed at bTB management and control in wild boar populations should take into account the effects of concomitant pathogens on the disease severity. The relationship between PCV2, *Metastrongylus* spp and ADV on bTB dynamics suggests that sanitary measures focused on the control of these agents (i.e., deworming or vaccination against viruses), may help to reduce the bTB prevalence in the affected areas.

Importantly, the interaction between the above-mentioned pathogens and *M. bovis* may influence the success of measures applied to reduce bTB prevalence in wild boar populations, such as bTB vaccination [55]. It has been shown that the protective efficacy of bTB vaccination in animals previously infected by helminths is deficient [44]. The biased Th2 immune response and hyporesponsiveness associated with chronic helminthiasis might impair their ability to mount an effective immune response after vaccination [56]. Thus, the presence of *Metastrongylus* spp in wild boar vaccinated against bTB may reduce the effectiveness of this vaccine whereas measures such as previous deworming may be useful in the estates where vaccination will be carried out. In fact, a significant improvement in mycobacterial-specific immune responses occurs following anthelmintic therapy in vaccinated humans [57]. However, experiences of deworming for disease control in both humans and wild animals have provided very contradictory results [58]. Consequently, these types of alternative management measures might have different consequences for disease control and should be carefully evaluated under different situations before any generalisation.

On the other hand, it is noteworthy that the greatest effects of co-infections in other wild hosts have been observed in seasons of food shortage [59]. This food deprivation would facilitate the creation of vicious circles between nutritional status, disease susceptibility and infection intensity [60]. In this sense, measures focused on maintaining a good nutritional status in wild boar would be essential for reducing the negative effects of concomitant pathogens in the development of bTB in this species, hence helping to reduce the prevalence of bTB in wild boar. However, managers should take into account that food quality is critical to a proper immune defence and resistance to pathogens [61]. The role of certain micronutrients (i.e., copper [62], vitamin D [63]) on bTB control is a good example of the importance of a balanced diet. In any case, further investigations are required before a massive supplemental feeding aimed at bTB control is used in wild boar populations, since artificial feeding favours an increased helminth infection rate in wild boar [64]. In addition, supplemental feeding could be beneficial mainly in fenced estates with artificially high densities, because it can increase wild boar densities in natural populations and might raise the risk of transmission of *M. bovis* in these populations.

To conclude, results obtained in this work provide a new point of view for bTB control based on community ecology principles. Removing specific members of the wild boar pathogen community should be seriously considered in further bTB management plans in wild boar. However, given the unexpected consequences of altering any community of organisms, further research should evaluate the impact of such measures under controlled conditions.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge M. Gil and E. Varela for their support in the sampling procedures.

References

1. Pérez JM, Meneguz PG, Dematteis A, Rossi L, Serrano E (2006) Parasites and conservation biology: The 'ibex-ecosystem'. *Biodivers Conserv* 15: 2033-2047.
2. Hatcher MJ, Dunn AM (2011) Parasites in ecological communities, from interactions to ecosystems. Cambridge: Cambridge University Press. 439 p.
3. Reich NG, Shrestha S, King AA, Rohani P, Lessler J, et al. (2013) Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *J R Soc Interface* 10: 86.
4. Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, et al. (2010) Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243-246.
5. Yacob HT, Terefe G, Jacquet P, Hoste H, Grisez C, et al. (2006) Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: Effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. *Vet Parasitol* 137: 184-188.
6. Graham AL, Cattadori IM, Lloyd-Smith JO, Ferrari MJ, Bjornstad ON (2007) Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends Parasitol* 23: 284-291.
7. Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, et al. (2010) Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol* 40: 1171-1176.
8. Pathak AK, Pelensky C, Boag B, Cattadori IM (2012) Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infections: Observations from the field and evidence from the laboratory. *Int J Parasitol* 42: 647-655.
9. Lass S, Hudson PJ, Thakar J, Saric J, Harvill E, et al. (2013) Generating super-shedders: Co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *J R Soc Interface* 10: 80.

10. Thakar J, Pathak AK, Murphy L, Albert R, Cattadori IM (2012) Network model of immune responses reveals key effectors to single and co-infection dynamics by a respiratory bacterium and a gastrointestinal helminth. *PLoS Comp Biol* 8: e1002345.
11. Black TC (1946) Coexistent hookworm and tuberculosis. *South Med J* 39: 881-884.
12. Li XX, Zhou XN (2013) Co-infection of tuberculosis and parasitic diseases in humans: A systematic review. *Parasit Vectors* 6: 79.
13. Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, Rottenberg ME, Källenius G (2012) Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Path* 8: e1002464.
14. Bordes F, Morand S (2011) The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infect Ecol Epidemiol* 1: 7346.
15. Fitzgerald SD, Kaneene JB (2013) Wildlife Reservoirs of Bovine Tuberculosis Worldwide: Hosts, Pathology, Surveillance, and Control. *Vet Pathol* 50: 488-499.
16. Gortazar C, Cowan P (2013) Introduction to this issue: Dealing with TB in wildlife. *Epidemiol Infect* 141: 1339-1341.
17. Ezenwa VO, Etienne RS, Luikart G, Beja-Pereira A, Jolles AE (2010) Hidden consequences of living in a wormy world: Nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *Am Nat* 176: 613-624.
18. Jolles AE, Ezenwa VO, Etienne RS, Turner WC, Olf H (2008) Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* 89: 2239-2250.
19. Risco D, Fernandez-Llario P, Garcia-Jimenez WL, Goncalves P, Cuesta JM, et al. (2013) Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations. *Trans Emerg Dis* 60 Suppl 1: 121-127.

20. Rafi W, Ribeiro-Rodrigues R, Ellner JJ, Salgame P (2012) 'Coinfection-helminthes and tuberculosis'. *Curr Opin HIV AIDS* 7: 239-244.
21. Risco D, García A, Serrano E, Fernandez-Llario P, Benítez JM, et al. (2013) High-Density Dependence But Low Impact on Selected Reproduction Parameters of *Brucella suis* Biovar 2 in Wild Boar Hunting Estates from South-Western Spain. *Trans Emerg Dis*: In press.
22. Boitani L, Mattei L (1992) Aging wild boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. In: Spitz F, Janeau G, González G, Aulagnier S, editors. *Ongules/Ungulates 91*. Toulouse: SFEPM-IRGM. pp. 419-421.
23. Santos N, Geraldes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M (2010) Diagnosis of Tuberculosis in the Wild Boar (*Sus scrofa*): A comparison of Methods Applicable to Hunter-Harvested Animals. *PLoS ONE* 5: e12663.
24. Corner LA, Trajstman AC (1988) An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet Microbiol* 18: 127-134.
25. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR (1991) Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 27: 187-195.
26. Kamerbeek J, Schouls J, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, et al. (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.
27. Menin Ã, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, et al. (2013) Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. *PLoS ONE* 8: e53884.

28. Martín-Hernando MP, Höfle U, Vicente J, Ruiz-Fons F, Vidal D, et al. (2007) Lesions associated with Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* 87: 360-367.
29. Oliveira S, Galina L, Pijoan C (2001) Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Investig* 13: 495-501.
30. Cho WS, Chae C (2003) PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization. *Lett Appl Microbiol* 37: 56-60.
31. Anderson DR, Burnham KP, Thompson WL (2000) Null hypothesis testing: Problems, prevalence, and an alternative. *J Wildl Manage* 64: 912-923.
32. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Parasitology* 83: 575-583.
33. Gotelli NJ (2000) Null model analysis of species co-occurrence patterns. *Ecology* 81: 2606-2621.
34. Stone L, Roberts A (1990) The checkerboard score and species distributions. *Oecologia* 85: 74-79.
35. Gotelli NJ, McCabe DJ (2002) Species co-occurrence: A meta-analysis of J. M. Diamond's assembly rules model. *Ecology* 83: 2091-2096.
36. Gotelli NJ, Rohde K (2002) Co-occurrence of ectoparasites of marine fishes: A null model analysis. *Ecol Lett* 5: 86-94.
37. Serrano E, Lopez-Soria S, Trinchera L, Segales J (2014) The use of null models and partial least squares approach path modelling (PLS-PM) for investigating risk factors influencing post-weaning mortality in indoor pig farms. *Epidemiol Infect* 142: 530-539.

38. Calero-Bernal R, Gomez-Gordo L, Saugar JM, rontera E, Perez-Martín JE, et al. (2013) Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *J Wildl Dis* 49: 1019-1023.
39. Haenlein M, Kaplan AM (2004) A beginners's guide to Partial Least Squares analysis. *Underst Stat* 3: 283-297.
40. Geladi P, Kowalski B (1986) Partial Least Squares Regression: a tutorial. *Anal Chim Acta* 185: 1-17.
41. Abbi H (2007) Partial least square regression PLS-Regression. In: Salkind N, editor. *Encyclopedia of Measurement and Statistics: Thousands Oaks*. pp. 741-745.
42. Sánchez G, Trinchera L (2010) plsppm: Partial Least Squares data analysis methods. R package version 0.3.7.
43. Team RDC (2014) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
44. Elias D, Akuffo H, Pawlowski A, Haile M, Schön T, et al. (2005) Schistosoma mansoni infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 23: 1326-1334.
45. Serrano E, Millán J (2013) What is the price of neglecting parasite groups when assessing the cost of co-infection? *Epidemiol Infect: In Press*.
46. Salgame P (2005) Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 17: 374-380.
47. Kekarainen T, Montoya M, Mateu E, Segalés J (2008) Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* 89: 760-765.
48. Kamal SM, El Sayed Khalifa K (2006) Immune modulation by helminthic infections: Worms and viral infections. *Parasite Immunol* 28: 483-496.

49. Pejsak ZK, Truszczynsky MJ (2006) Aujeszky's Disease. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 419-435.
50. Moller AP, Jennions MD (2002) How much variance can be explained by ecologist and evolutionary biologists? *Oecologia (Berl)* 132: 492-500.
51. Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernández-De-Mera IG, et al. (2005) Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol Ecol* 14: 3209-3217.
52. Diedrich CR, Flynn JL (2011) HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfection immunology: How does HIV-1 exacerbate tuberculosis? *Infect Immun* 79: 1407-1417.
53. Elias D, Akuffo H, Thors C, Pawlowski A, Britton S (2005) Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clin Exp Immunol* 139: 398-404.
54. Bollo E, Ferroglio E, Dini V, Mignome W, Biolatti B, et al. (2000) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Lymph Nodes of Wild Boar (*Sus scrofa*) by a Target-Amplified Test System. *J Vet Med B/Zentralbl Veterinaarmed Reihe B* 47: 337-342.
55. Garrido JM, Sevilla IA, Beltrán-Beck B, Minguijón E, Ballesteros C, et al. (2011) Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PLoS ONE* 6: e24905.
56. Borkow G, Bentwich Z (2004) Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: Role of hyporesponsiveness and anergy. *Clin Microbiol Rev* 17: 1012-1030.

57. Elias D, Wolday D, Akuffo H, Petros B, Bronner U, et al. (2001) Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol* 123: 219-225.
58. Fenton A (2013) Dances with worms: the ecological and evolutionary impacts of deworming on coinfecting pathogens. *Parasitology* 140: 1119-1132.
59. Ezenwa VO, Jolles AE (2011) From host immunity to pathogen invasion: The effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integr Comp Biol* 51: 540-551.
60. Beldomenico PM, Begon M (2010) Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends Ecol Evol* 25: 21-27.
61. Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011) Nutritional Immunology: a multidimensional approach. *Plos Pathogens* 7: e1002223.
62. Downs SH, Durr P, Edwards J, Clifton-Hardley R (2008) Trace micro-nutrients may affect susceptibility to bovine tuberculosis in cattle. *Prev Vet Med* 87: 311-326.
63. Waters WR, Nonneke BJ, Rahner TE, Palmer MV, Whipple DL, et al. (2001) Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1204-1212.
64. Navarro-González N, Fernández-Llario P, Pérez E, Mentaberre G, Lavín S, et al. (2013) Supplemental feeding drives parasite communities of wild boar in Western Spain. *Vet Parasitol* 196: 114-123.
65. Thacker EL (2006) Mycoplasmal Diseases. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 701-718.
66. Gottschalk M, Taylor DJ (2006) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 563-576.

67. Rapp-Gabrielson VJ, Oliveira SR, Pijoan C (2006) *Haemophilus parasuis*. In: Straw B, Zimmermann J, D'Alaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 681-690.
68. Segalés J, Allan GM, Domingo M (2006) Porcine Circovirus Diseases. In: Straw B, Zimmermann J, D'Alaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 299-309.
69. Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, van Reeth K (2006) Swine Influenza. In: Straw B, Zimmermann J, D'Alaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 469-483.
70. Zimmerman J, Benfield DA, Murtaugh MP, Osorio F, Stevenson GW, et al. (2006) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In: Straw B, Zimmermann J, D'Alaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. 387-419.
71. García-González ÁM, Pérez-Martín JE, Gamito-Santos JA, Calero-Bernal R, Alcaide Alonso M, et al. (2013) Epidemiologic study of lung parasites (*Metastrongylus* spp.) in wild boar (*Sus scrofa*) in southwestern Spain. *J Wildl Dis* 49: 157-162.

Figure Legends

Figure 1. The study area is located in mid-western Spain where wild boar is the most important reservoir of bovine tuberculosis.

Figure 2. Wild boar showing localized (bTB like lesion in submandibular lymph node) (a) or generalized bTB lesion patterns (bTB like lesions in lungs) (b).

Figure 3. Relationships between exposure to viral infections (PCV2, both arrow and circles in pink, and ADV, in blue), nematode infection (in black) and age on PLSr component describing disease severity (arrow and circles in yellow) in *Mycobacterium bovis* infected wild boar. This plot represents the PLSr model shown in Table 4. Arrow way indicates either an increase or decrease in the component value. Arrow thickness directly indicates the contribution of each variable to PLSr X's component. Since swine influenza virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* explained less than 10% of the PLSr X's component, they were not represented in this plot. The wild boar silhouettes summarize those pathogen combinations linked to severe bovine tuberculosis (represented by several circles in yellow).

Tables

Table 1: Brief description of main clinical signs and lesions produced by the respiratory pathogens assessed. The type of assay carried out to diagnose them is also shown.

Pathogen	Type of assay	Clinical signs and lesions	Source
Bacteria			
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	blocking-ELISA	Associated with Enzootic Pneumonia, <i>M. hyopneumoniae</i> plays a primary role in the porcine respiratory complex causing important economic losses.	[65]
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	PCR	It causes pleuropneumonia that results in death, chronic or subclinical disease causing losses by mortality, reduced production, and increased costs of medication or vaccination.	[66]
<i>Haemophilus parasuis</i>	PCR	It is the etiological agent of the porcine arthritis polyserositis (Gasser's Disease) that may produce important losses mainly in intensive farm. Pneumonia in pigs as a primary or secondary agent.	[67]
Viruses			
Porcine Circovirus type2	indirect-ELISA	PCV2 infection has been associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), porcine respiratory disease complex, and reproductive disorders.	[68]
Aujeszky's Disease Virus	indirect-ELISA	May produce high mortality in piglets with neurological disorders. Weaners may show pneumonic symptoms whereas in non-immune sows may produce reproductive disorders.	[49]
Swine Influenzavirus	indirect-ELISA	Cause of bronchointerstitial pneumonia and respiratory disease in pigs throughout large parts of the world.	[69]
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus	indirect-ELISA	PRRSV infections produce severe reproductive losses, interstitial pneumonia in pigs, reduction of growth performance, and increased mortality.	[70]
Helminths			
<i>Metastrongylus spp</i>	Direct retrieval at necropsy	It produces chronic granulomatous pneumonic lesions mainly in caudal lobes of the lungs. Cough with minimal other signs.	[71]

Table 2: Percentage of animals positive against the selected respiratory pathogens included in this study in 24 juveniles (6-12 months), 45 yearlings (13–24 months) and 96 adult (over 24 months) male and female wild boars hunter harvested in mid-western Spain.

Pathogen	Percentage of positive animals	Age-specific percentage of positive animals
Virus		
Porcine circovirus type 2	70.9%	Juveniles: 58.33% Yearlings: 71.11% Adults: 73.96%
Aujeszky's disease virus	69.70%	Juveniles: 45.83% Yearlings: 55.56% Adults: 82.80%
Swine influenza virus	24.24%	Juveniles: 16.67% Yearlings: 13.33% Adults: 31.25%
PRRS virus	0%	Juveniles: 0% Yearlings: 0% Adults: 0%
Bacteria		
<i>Mycobacterium bovis</i>	53.93%	Juveniles: 54.16% Yearlings: 57.78% Adults: 52.08%
<i>Haemophilus parasuis</i>	0%	Juveniles: 0% Yearlings: 0% Adults: 0%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4.84%	Juveniles: 0% Yearlings: 4.44% Adults: 6.25%
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13.94%	Juveniles: 16.67% Yearlings: 17.78% Adults: 11.46%
Helminths		
<i>Metastrongylus spp</i>	51.51	Juveniles: 66.67% Yearlings: 57.78% Adults: 44.79%

Table 3: Observed frequencies for different pathogen assemblages (%) including *Metastrongylus* spp and *Mycobacterium bovis* infection and, *Mycoplasma hyopneumonie* (Mhyo), Porcine circovirus type 2 (PCV2), Swine influenza virus (SIV), and Aujeszky's disease virus (ADV) antibody positivity in 165 adult, yearling and juvenile males and females wild boar hunter-harvested in mid-western Spain. Zero indicates lack of detectable antibodies or pathogen whereas 1 indicates presence of antibodies against the specific pathogen or the pathogen. For *Metastrongylus*spp and *M. bovis*, 1 indicates presence of the pathogen in the corresponding samples. In bold, some specific combinations that appeared in more than 5% of studied boars.

Pathogen group						Age class		
Helminths	Bacteria			Virus		Percentage		
<i>Metastrongylus</i> spp	<i>M. bovis</i>	<i>Mhyo</i>	PCV2	SIV	ADV	Adults	Yearlings	Juveniles
0	1	0	1	0	1	11.2%	3.6%	4.2%
1	1	0	1	0	1	9.2%	9.1%	16.7%
1	1	0	1	1	1	9.2%	1.8%	4.2%
0	0	0	1	0	1	9.2%	7.3%	0%
1	0	0	1	0	1	8.2%	7.3%	8.3%
1	1	0	1	0	0	2%	9.1%	8.3%
0	0	0	1	0	0	3.1%	7.3%	4.2%
0	1	0	1	0	0	3.1%	7.3%	4.2%
0	0	1	1	0	0	0%	7.3%	0%
0	0	0	0	0	0	2%	5.5%	4.2%
1	0	0	0	0	1	2%	5.5%	4.2%
0	0	0	1	0	0	3.1%	7.3%	4.2%
1	1	1	1	1	1	1%	0%	0%

Table 4: Observed (O) and expected by chance (E) values of the C-score for positive/negative matrices of virus, bacteria and helminth communities on 24 juveniles, 45 yearlings and 96 adult wild boar from mid-western Spain.

Age class	C-score			
	O	E	p	SES
Juveniles	4.46	4.19	0.15	1.14
Yearlings	19.31	18.70	0.78	0.68
Adults	39.93	36.11	0.01	2.71

Table 5: Predictor weights of the Partial Least Squares regression (PLSr) model explaining the effects of presence of antibodies elicited by porcine circovirus type 2 (PCV2), Aujeszky's disease virus (ADV), swine influenza virus (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae* and co-infection by *Metastrongylus* lung nematodes on bTB severity. Predictor weights represent the contribution of each pathogen infection to the PLSr's X axis. Predictor weights explaining more than 10% of the total variance in each response variable are shown in bold type. The exposure to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *Haemophilus parasuis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* were excluded from this analysis since due to their prevalence in studied wild boar population was lower than 5% (see table 2).

Pathogens	Predictor weights	% Variance explained
PCV2	0.574	33.2
<i>Metastrongylus</i> spp	0.554	30.9
ADV	0.442	19.6
Age	-0.345	11.9
Sex	0.162	2.7
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	- 0.132	1.7
SIV	-0.01	0

Figure 1



Figure 2

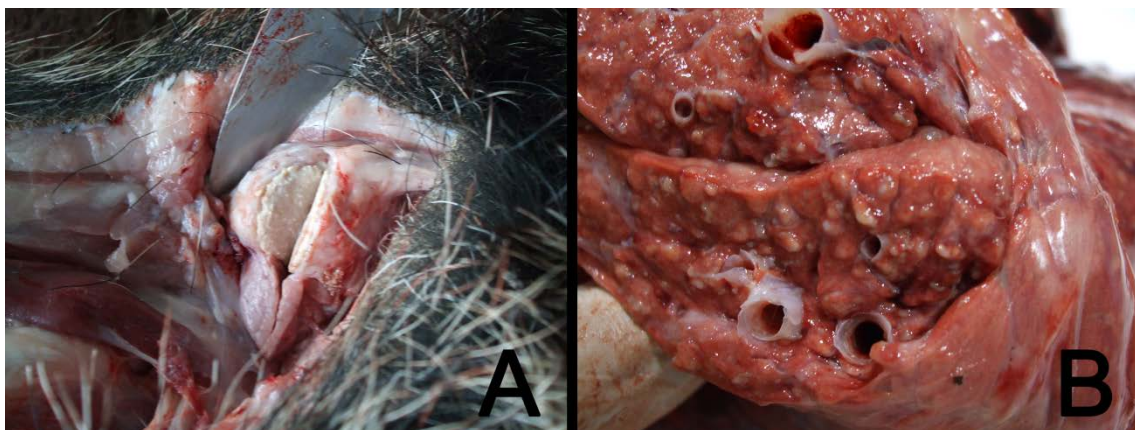
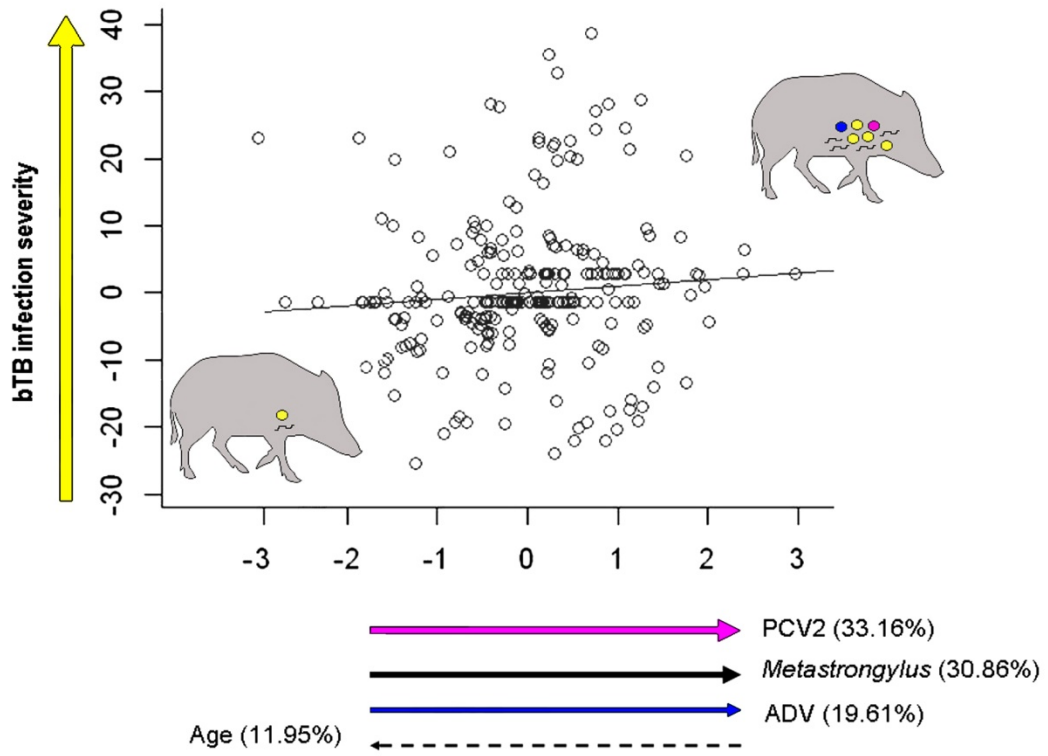


Figure 3



Bloque III

Estudio descriptivo de diferentes brotes de enfermedades infecciosas en poblaciones de jabalí. Marco epidemiológico y aplicación de medidas de control

5. Bloque III: Estudio descriptivo de diferentes brotes de enfermedades infecciosas en poblaciones de jabalí. Marco epidemiológico y aplicación de medidas de control

Como hemos comentado en apartados anteriores, la mayoría de los trabajos enfocados al estudio de las enfermedades infecciosas en el jabalí se basan en muestreos realizados sobre animales abatidos en acciones cinegéticas denominadas monterías. Este tipo de muestreos dan lugar a un gran volumen de información, que convenientemente analizada e interpretada, permite obtener conclusiones referentes a la epidemiología y a las repercusiones lesionales que estos patógenos producen en los animales infectados. Sin embargo, generalmente la utilización de esta metodología no valora el efecto que las enfermedades infecciosas tienen en determinados grupos poblacionales del jabalí.

En primer lugar, el repertorio de animales abatidos en monterías raramente incluye animales menores de siete meses debido a que la caza de este tipo de animales no está permitida legalmente. Este hecho excluye de los estudios tradicionales al sector poblacional más joven, precisamente el más susceptible a padecer la acción de muchos patógenos infecciosos (Wegener y cols., 2006; Register y cols., 2012).

Por otra parte, el tipo habitual de muestreo no permite estudiar el efecto que las enfermedades infecciosas producen en los jabalíes criados en sistemas de producción más intensivos. En los últimos años y debido a la gran demanda existente, el número de explotaciones “semi-intensivas” de cría de jabalí se ha incrementado notablemente en nuestro país. La finalidad de este tipo de explotaciones suele ser abastecer de animales a fincas en las que se realizarán acciones cinegéticas en un futuro próximo, garantizando un número mínimo de animales durante la cacería. Sin embargo, en muchas ocasiones el número de jabalíes criados en este tipo de explotaciones no es el esperado, debido a la aparición de problemas sanitarios que dan

lugar a elevadas mortalidades dentro de la población. De este modo, para garantizar la viabilidad económica de este tipo de explotaciones es necesario conocer cuáles son las enfermedades infecciosas que pueden afectar en mayor medida a los jabalíes criados en estas condiciones y diseñar medidas de control y prevención eficaces frente a estas patologías.

Además, los muestreos realizados en monterías no incluyen generalmente animales que puedan estar desarrollando una enfermedad infecciosa de forma aguda o grave. La gran mayoría de los jabalíes abatidos en acciones cinegéticas son animales aparentemente sanos, que pueden estar infectados por determinados patógenos o mostrar lesiones crónicas provocadas por estos, pero que raramente muestran cuadros lesionales característicos de procesos agudos. Por último, este tipo de muestreos no se puede realizar durante todo el año ya que se ciñe a la temporada de caza que se desarrolla entre los meses de octubre y febrero. De este modo, no se puede determinar el estado sanitario de los jabalíes en épocas como el verano, que debido a las altas temperaturas y a la escasez de recursos podría ser crítica para estos animales.

Así, para obtener una visión más completa de cómo las enfermedades infecciosas afectan al jabalí, es necesario desarrollar trabajos enfocados a estos sectores poblacionales tradicionalmente menos estudiados. En este capítulo se presentan un total de seis trabajos que nacen fruto de la aparición de mortalidades en diferentes poblaciones de jabalíes. En ellos, se realiza un diagnóstico de las enfermedades infecciosas causantes de dichas mortalidades y se describe el marco epidemiológico en el que se desarrolla cada brote. Además, en los casos en los que fue necesario, se describen las medidas de control llevadas a cabo para paliar los efectos de estos brotes, valorando su eficacia.

5.1 Brote de mal rojo en una finca semi-intensiva de jabalí en España. (*Outbreak of Swine Erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain*).

El mal rojo es una enfermedad del cerdo doméstico que tiene un gran impacto económico en granjas de porcino de todo el mundo (Wood y cols., 2006). Esta enfermedad está causada por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*), un patógeno bacteriano que puede afectar a muchas otras especies animales entre las que se incluye el hombre (Brooke y cols., 1999).

El principal reservorio de esta bacteria es el cerdo doméstico, que excreta el microorganismo a través de sus secreciones naturales, como la saliva o la orina. La ruta de contagio más frecuente es mediante la ingestión de comida o agua contaminadas por bacilos excretados por animales portadores o enfermos (Laber y cols., 2002). El mal rojo suele aparecer en cerdos de edades comprendidas entre los 3 meses y los 3 años y suele estar asociado a la presencia de algunos factores predisponentes tales como cambios bruscos en la nutrición o en las condiciones ambientales (Wood y cols., 2006).

Podemos encontrar tres formas clínicas de mal rojo: aguda, subaguda o crónica (Conklin, 1979). Las formas agudas suelen dar lugar a muertes fulminantes. Los animales afectados presentan las lesiones típicas de un proceso septicémico y pueden mostrar además, lesiones cutáneas características de esta enfermedad. Por su parte, en las formas subagudas los animales no muestran ninguna sintomatología característica más allá de la presencia de lesiones cutáneas, mientras que en los cuadros crónicos se suelen apreciar artritis y endocarditis (Wang y cols., 2010).

El jabalí también puede verse afectado por *E. rhusiopathiae*. Así, en España se han descrito seroprevalencias cercanas al 5 % frente a esta bacteria (Vicente y cols., 2002). Además, en Japón se ha demostrado que las infecciones por este patógeno pueden producir mortalidad en esta especie (Yamamoto y cols., 1999). Sin embargo, se conoce poco acerca de los cuadros lesionales que las infecciones por este

microorganismo producen en el jabalí. Este trabajo describe un brote de mal rojo en una explotación semi-intensiva de jabalíes realizando un estudio microbiológico y lesional completo en algunos de los animales afectados por la enfermedad.

El brote fue declarado en una finca situada en el noreste de la provincia de Badajoz (España). La finca, totalmente vallada, se encuentra dividida en dos partes: una zona de 500 hectáreas donde vivían aproximadamente 120 jabalíes; y otra parte de 5 hectáreas que se utilizaba como granja semi-intensiva para la cría del jabalí, la cual albergaba un total de 40 animales en el momento del brote: 28 adultos (entre 1 y 3 años de edad) y 12 jóvenes (entre 3 meses y 1 año de edad). La granja está dotada con comederos donde los animales son alimentados diariamente con un pienso comercial. Además, dispone de diferentes cercados que permiten el manejo y separación de los animales.

En la semana del 11 al 18 de febrero de 2010, siete jabalíes fueron encontrados muertos en el área intensiva de la finca. Dichos animales no habían mostrado ninguna sintomatología previa. Cuatro de ellos fueron examinados mediante la realización de una necropsia reglada, durante la cual se obtuvieron las muestras necesarias para llevar a cabo el análisis histopatológico de los principales órganos. Por otra parte, se realizaron cultivos microbiológicos en agar sangre utilizando material procedente de hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, cerebro y membrana sinovial de la articulación del carpo. La identificación de las colonias obtenidas se realizó mediante la utilización de galerías API Coryne® (Biomeriux, France). Por último, se recolectaron muestras de sangre procedentes del corazón de los animales estudiados y de nueve animales adultos que permanecieron vivos después de la declaración del brote. Dichas muestras se utilizaron para detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a *E. rhusiopathiae* con un kit ELISA comercial (INGEZIM MAL ROJO, INGENASA, España).

Tres de los cuatro animales estudiados fueron animales aproximadamente de 3 meses de edad que mostraban una buena condición física. Todos ellos mostraron lesiones típicas de un cuadro septicémico con congestión generalizada, presencia de eritemas o cianosis en la piel y hemorragias petequiales en riñón, vejiga de la orina,

pulmón, arteria pulmonar y meninges. Uno de estos animales presentó además una marcada opacidad corneal bilateral (Imagen 21). El otro animal estudiado tenía una edad aproximada de un año y mostró, aparte de las lesiones típicas de procesos septicémicos, una poliartritis proliferativa.

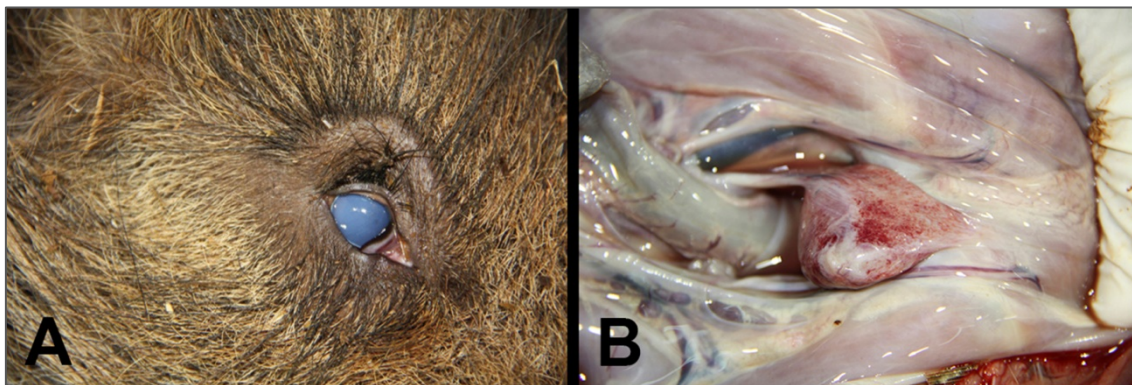


Imagen 21: Lesiones macroscópicas observadas en jabalíes afectados por mal rojo. A) Opacidad corneal. B) Presencia de hemorragias en vejiga de la orina sin contenido urinario.

El estudio histopatológico reveló la presencia de un cuadro de coagulación intravascular diseminada, presencia de microtrombos de fibrina y vasculitis con inflamación de células endoteliales e infiltración de leucocitos y hemorragias perivasculares (Imagen 22). Estas lesiones fueron especialmente visibles en riñones, vejiga de la orina y en la piel. Las lesiones oculares observadas en uno de los individuos estudiados se correspondieron con un edema corneal difuso acompañado de una panuveítis con presencia de vasculitis. La tinción específica de Gram realizada en la vejiga de la orina, los riñones y el ojo confirmó la presencia de bacterias gram-positivas en la luz de los vasos sanguíneos.

Erysipelothrix rhusiopathiae fue aislado como cultivo puro en todos los tejidos que se sometieron a cultivo microbiológico. Sin embargo, en sólo uno de los cuatro animales estudiados se detectaron anticuerpos específicos frente a este microorganismo.

Hasta la fecha era conocido que las poblaciones de jabalíes españolas tenían contacto con *E. rhusiopathiae* ya que se había detectado la presencia de anticuerpos específicos frente a este microorganismo (Closa-Sebastiá y cols., 2011). Este artículo

realiza por primera vez una descripción clínica y lesional completa de un brote de mal rojo en una población de jabalíes. Los animales afectados padecieron, tanto formas agudas de mal rojo, con muertes repentinas sin mostrar síntomas previos; así como formas crónicas con la presencia de artritis. Las lesiones observadas en ellos fueron similares a las previamente descritas en cerdo. Sin embargo, en este brote no se observaron las típicas lesiones cutáneas que aparecen en los brotes de esta enfermedad, posiblemente por el carácter sobreagudo de los casos observados (Wood y cols., 2006).

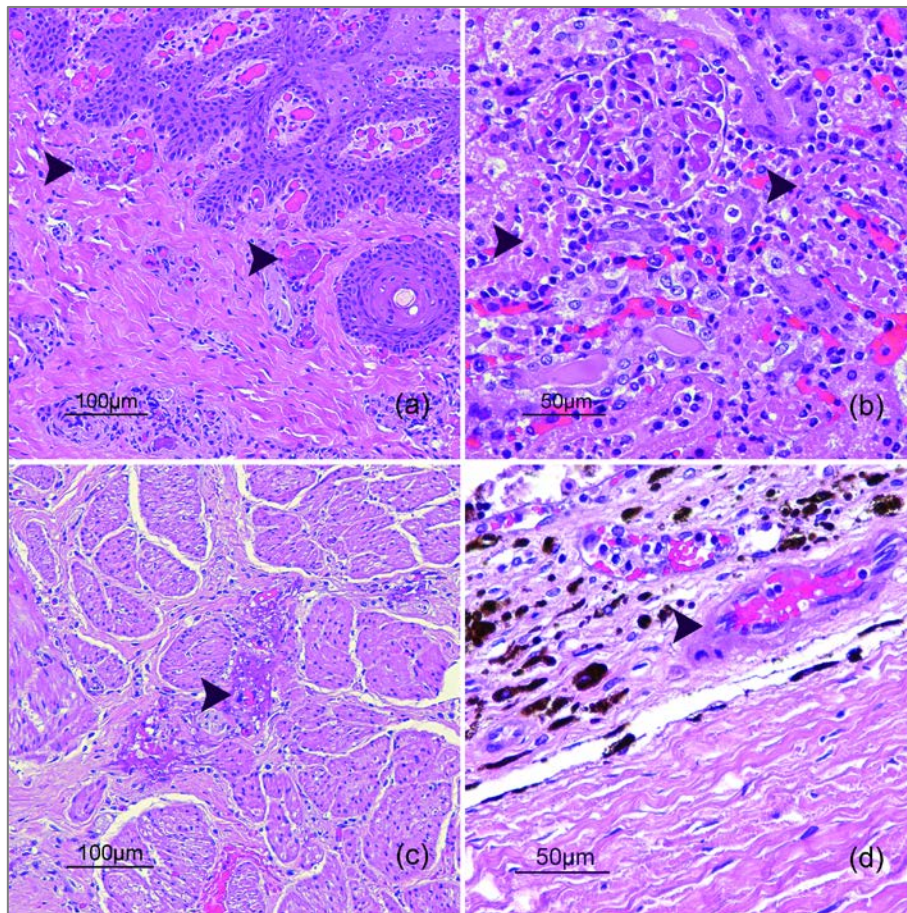


Imagen 22: Lesiones septicémicas encontradas durante el estudio histopatológico de los jabalíes afectados por mal rojo. a) Piel. Marcada hiperemia y presencia de trombos de fibrina (flecha). HE. Barra=100 µm. b) Riñón. Trombos de fibrina en capilares glomerulares y necrosis tubular con nefritis intersticial (flecha). HE. Barra=50 µm. c) Vejiga de la orina. Necrosis fibrinoide en pequeños vasos sanguíneos y presencia de colonias bacterianas. HE. Barra=100 µm. d) Coroides. Necrosis fibrinoide de pequeños vasos sanguíneos (flecha). HE. Barra=50 µm.

Por otra parte, resulta novedosa la aparición de lesiones oculares, ya que este tipo de lesiones no habían sido previamente relacionadas con casos de mal rojo.

Algunas infecciones con *E. rhusiopathiae* habían sido asociadas a patologías oculares en otras especies animales y en humano; sin embargo, la presencia de infecciones mixtas no permitió esclarecer si *E. rhusiopathiae* desarrollaba un papel principal (Seahorn y cols., 1989; Kiluge y cols., 1992; Elvy y cols., 2008). Por el contrario, en nuestro caso el estudio histopatológico confirma la implicación de este microorganismo en las lesiones oculares halladas, ya que se observan gran cantidad de bacilos gram-positivos y una vasculitis similar a la observada en otros órganos.

Algunos de los factores de riesgo más importantes asociados a la aparición de brotes de mal rojo (pobres condiciones higiénicas, temperaturas extremas, fuertes parasitaciones) se pudieron observar en la explotación afectada y pudieron estar relacionados con la aparición de este brote (Wang y cols., 2010).

Las medidas desarrolladas para paliar los efectos de este brote se centraron tanto en la aplicación de antibioterapia, como en la lucha frente a los factores predisponentes presentes en la explotación (desparasitación con flubendazol en pienso a una concentración de 30 partes por millón (ppm)). La antibioterapia comenzó a los 5 días de registrar la primera muerte en la explotación y consistió en la administración de oxitetraciclina en el pienso a una concentración de 250 ppm y la aplicación de penicilina parenteral a los animales que mostraban algún tipo de sintomatología. Los días posteriores a la instauración del tratamiento no se registraron más bajas en la explotación. Una vez finalizado el brote, se instauró un plan de vacunación sistemática de todos los animales que habitaban la zona semi-intensiva utilizando una vacuna comercial (PARVOSUIN-MR, Hipra, España).

La presencia de infecciones por *E. rhusiopathiae* en el jabalí puede suponer un riesgo para la cabaña porcina doméstica, sobre todo en aquellas explotaciones en las que las medidas de bioseguridad son escasas y los suidos domésticos y salvajes comparten pastos y puntos de abastecimiento (Parra y cols., 2003). Por otra parte, las infecciones por *E. rhusiopathiae* en jabalí pueden suponer un riesgo para los humanos, sobre todo para los grupos que mantienen un estrecho contacto con estos animales

como veterinarios, carniceros o taxidermistas, ya que ellos podrían contactar fácilmente con animales infectados o con sus secreciones (Wood, 1975).

RAPID COMMUNICATION

Outbreak of Swine Erysipelas in a Semi-Intensive Wild Boar Farm in Spain

D. Risco¹, P. F. Llario², R. Velarde³, W. L. García¹, J. M. Benítez¹, A. García¹, F. Bermejo¹, M. Cortés¹, J. Rey¹, J. H. de Mendoza¹ and L. Gómez⁴

¹ Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UEX, Cáceres, Spain

² Unidad de Biología y Etología, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Veterinaria, UEX, Cáceres, Spain

³ Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, UEX, Cáceres, Spain

Keywords:

Erysipelothrix rhusiopathiae; wild boar; swine erysipelas; panuveitis; vasculitis

Correspondence:

D. Risco. Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UEX. Avda. Universidad sn. C.P. 10003 Cáceres, Spain.
Tel.: +34927257114;
Fax: +34927257110;
E-mail: riscope@unex.es

Received for publication December 1, 2010

doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01234.x

Summary

Swine erysipelas (SE) is a disease caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae* and is one of the best-known and most serious diseases affecting domestic pigs. However, few studies exist concerning the susceptibility of wild boars to this disease and the role of this species as a reservoir. This study investigates and describes an outbreak of SE that occurred on a semi-intensive wild boar breeding farm housing 40 boars in Extremadura (SW Spain) on 11–18 February 2010. Seven animals died, of which four were examined post-mortem. Of these, three (two females and one male) were approximately 3 months old, and one was 1 year old (male). Lesions were consistent with acute septicaemia, consisting of cutaneous erythema/cyanosis and petechial haemorrhages in kidneys, urinary bladder, lungs and meninges. The 1-year-old male also had proliferative polyarthritis. Histopathology confirmed the presence of disseminated intravascular coagulation and vasculitis. Additionally, a bilateral acute panuveitis with concurrent necrotizing vasculitis and diffuse corneal oedema, neither of which have been described before in this disease, were found in the 3-month-old male boar. *E. rhusiopathiae* was isolated from all four animals in pure cultures from several tissues. Of these four animals, antibodies against *E. rhusiopathiae*, using an indirect ELISA test, were only detected in the 1-year-old male boar with polyarthritis. Posteriorly, of nine live adults tested for antibodies, four (including an adult male with polyarthritis) were positive.

Introduction

Swine erysipelas (SE) is a disease found all over the world that has an important economic impact on pig farming (Wood and Henderson, 2006). The cause of SE is *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*), a small Gram-positive, facultative anaerobic, non-spore-forming and non-acid-fast bacillus (Brooke and Riley, 1999). Although SE is the best-known disease caused by *E. rhusiopathiae*, this microorganism also causes disease in other domestic animals, particularly in turkeys and sheep (Wang et al., 2010). This pathogen is also a zoonotic agent, and infec-

tions in humans may result in cutaneous erysipeloid lesions, endocarditis and septicaemia (Brooke and Riley, 1999).

The source of infection in an outbreak of erysipelas is seldom known. The most important reservoir of *E. rhusiopathiae* is domestic pigs, which may act as apparently healthy carriers. Up to 10–50% of healthy swine harbour the organism in their oropharynx (tonsils) (Okolo, 1986; Takahashi et al., 1987), and infected or subclinically diseased animals act as a source from which other individuals can be infected. Bacterial shedding has been demonstrated to occur in nasal secretions, saliva and

faeces in both healthy and sick pigs (Laber et al., 2002). Nevertheless, pigs are not the only reservoir of *E. rhusiopathiae*, and over 30 species of wild birds and at least 50 species of wild mammals are also known to harbour this pathogen (Wang et al., 2010).

The most common routes of infection are via the ingestion of contaminated food or water and skin wounds (Laber et al., 2002). Pigs between 3 months and 3 years old are most susceptible to erysipelas (Wood and Henderson, 2006), and there is evidence to suggest that environmental and stress factors can predispose animals to the disease. For example, sudden changes in nutrition, environmental temperature and fatigue are commonly linked to the appearance of SE (Wood and Henderson, 2006). As well, parasitic infestations have been reported to increase the severity of clinical SE (Wood and Henderson, 2006).

Three clinical forms of SE have been described in the domestic pig: acute, subacute and chronic (Conklin and Steele, 1979). The acute form begins with sudden deaths in the group and lesions consistent with septicaemia such as diffuse areas of cutaneous erythema/cyanosis or the appearance of well-defined rhomboid-shaped red-purple lesions. In the subacute forms, pigs do not usually show any signs of disease, while chronic forms are characterized by the appearance of arthritis and endocarditis (Wood and Henderson, 2006; Wang et al., 2010).

Domestic pigs and wild boar belong to the same species and are susceptible to similar types of pathogens (Yamamoto et al., 1999), including *E. rhusiopathiae* (Lipowski, 2003). In Spain, serological studies indicate that 5% of wild boars possess antibodies against *E. rhusiopathiae* (Vicente et al., 2002, Closa-Sebastià et al., 2011), although cases of SE in this species have yet to be fully described. The isolation in Japan of *E. rhusiopathiae* from farmed wild boars with acute septicaemic erysipelas was mentioned in a study by Yamamoto et al. (1999), but the lesions were not described.

Currently, many wild boar populations in south-central Spain are subject to management practices, such as fencing, feeding and translocation. These measures may lead to both a rise in wild boar population densities and potentially an increase in the risk of exposure to infectious pathogens (Gortazar et al., 2006). As farmed wild boar numbers and stocking rates increase, diseases such as SE may well assume greater economic importance in areas such as Japan (Yamamoto et al., 1999). Infected wild boars may become a hazard for the domestic pig-rearing industry, as this disease could be transmitted from one population to another. Furthermore, the presence of SE in wild boars could become a public health hazard because of its zoonotic character (Wang et al., 2010).

This work describes an outbreak of SE in a semi-intensive wild boar breeding farm in Spain and is accompanied by a pathological and microbiological study of the affected animals.

Materials and Methods

Study site

The outbreak was declared in a wild boar population located in Puebla de la Reina (NE Badajoz Province, Extremadura, SW Spain). This area has a continental thermo-Mediterranean climate, with hot dry summers and mild and moderately wet winters. The vegetation consists mainly of scrubland (genus *Cistus* sps, e.g. *C. ladanifer*) and evergreen oak forests (*Quercus suber*). February 2010, the month in which the outbreak occurred, was cold and extremely wet. According to the Spain's State Meteorological Agency (AEMET) of the Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs, the mean temperature and rainfall in February were 9.8°C and 166.6 l per square metre in 2010 compared to historic values of 10.1 and 54.2, respectively.

The home range of this population is surrounded by a fence and divided into two very different parts. The first consists of a 'free-ranging area' of about 500 ha in which approximately 120 wild boars live with almost no restrictions on their mobility and feed naturally. This population is composed mostly of 1- to 2-year-old boars (70%); the remaining animals are older. There are similar numbers of males and females because the area is not hunted and the birth/sex ratio, which is about 50 : 50, is maintained. These data have been obtained through an analysis of the photographs taken by four cameras (HCO Scoutguard SG550-V Camo; HCO Outdoor Products, Norcross, GA, USA) located near drinking points. The cameras are checked on a weekly basis.

The second area consists of a fenced-off enclosure of about 5 ha within the first area with physical barriers that prevent animals from dispersing. This area is a semi-intensive breeding farm, although no barn or any other kind of shelter is provided for the boars. The outbreak occurred in this second area where at the time there were 40 animals, 28 adults, mostly 1–3 years old (20 sows and eight boars) and 12 young animals between 3 months and 1 year old (seven males and five females). Within this area, there are three other small fenced-off areas with a system of coordinated doors to allow the separation and manipulation of the animals when required. In these small fenced-off areas, there are several feeders. Supplementary food is provided every day in this area and is based on commercial fodder specifically designed for this species and these age groups. Young animals are fed a growth-promoting diet (JB-2, Iniciativas Alimentarias S.A.,

INALSA, Torralba de Calatrava, Ciudad Real, Spain), which is provided in feeders that are designed exclusively for the young animals and which the adults cannot access. Adult animals have a maintenance diet (JB-4, Iniciativas Alimentarias S.A., INALSA, Torralba de Calatrava), which is also supplied in separate feeders. All animals are identified with plastic ear-tags when they are 3 months old.

Only the officially recommended vaccines are given to the pigs in the farm. All animals were vaccinated against Aujeszky's disease with a commercial inactivated vaccine (Aukipra-BK, Hipra, Amer, Spain). Hygienic conditions were poor in the farm, as there was no systematic plan for the disinfection and disposal of organic waste. Farm workers check the semi-intensive breeding installations every day and carry out maintenance and animal-feeding work.

Clinical signs and treatment

In the week 11–18 February 2010, seven wild boars were found dead by the farm workers next to the feeders. No clinical signs were observed prior to the deaths, and no important health problems had been detected on the farm. The treatment given to the surviving boars consisted of oxytetracyclin (200 ppm) and flubendazole (30 ppm) added to the feed for 10 days starting on 15 February. An adult male wild boar with clinical signs of tarsal and carpal arthritis, observed 3 weeks after the beginning of the outbreak, was successfully treated with long-acting penicillin (no attempt was made to isolate bacteria from the affected joints). No further cases were detected on the farm, and 3 months later, all animals were vaccinated with a commercial vaccine (PARVO-SUIN-MR[®], Hipra, Spain).

Pathologic examination

A post-mortem examination was performed on four dead animals, and multiple tissue samples were processed for histopathology. Briefly, tissues were placed in 10% buffered formalin, trimmed and embedded in paraffin, sectioned at 3–4 μm and stained with haematoxylin and eosin. Sections of the urinary bladder, kidney and eye were also stained with Gram's stain.

Bacterial isolation and identification

Tissue samples from liver, spleen, kidney, lung, heart, brain and the synovial membrane of the carpal joint collected during necropsy were cultured on blood agar. The plates were incubated for 24 h at 37°C in aerobic conditions. To identify the microorganisms obtained, Gram's stain and routine biochemical tests (catalase and oxidase tests) were

applied. Identification was confirmed with the use of API Coryne[®] galleries (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Antibody detection

A blood sample was collected from the heart of the necropsied animals. Three weeks after the beginning of the outbreak, blood samples were obtained from nine adult animals (five males and four females) in the semi-intensive breeding farm. Blood was collected from the orbital venous sinus (as described in Wood and Henderson, 2006). Samples were centrifuged at 1200 g for 15 min, and the serum was then removed and stored at –20°C until tested for antibodies against *E. rhusiopathiae*. A commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test was used (Ingezim Mal Rojo; Ingenasa S.A., Madrid, Spain) according to the manufacturer's protocol.

Results

Pathologic examination

Seven of the 40 wild boars housed in the restricted area in the breeding farm died suddenly, of which four were studied. Of these, three (two females and one male) were approximately 3 months old and one was 1 year old (male), and all were in good physical condition. All had lesions consistent with acute septicaemia with diffuse-to-irregular patches of ventral cutaneous erythema and/or cyanosis, generalized internal congestion and petechial-to-ecchymotic haemorrhages in the kidneys, urinary bladder, lungs, pulmonary artery and meninges. The 3-month-old male boar had bilateral corneal opacity (oedema) (Fig. 1), while the 1-year-old boar had a moderate proliferative polyarthritis. A large number of intestinal nematodes such as *Ascaris suum* and *Trichuris suis* were identified in all four animals.

All four boars studied had similar histopathological lesions. Histopathology confirmed the presence of



Fig. 1. Wild boar. Eye. Diffuse corneal oedema.

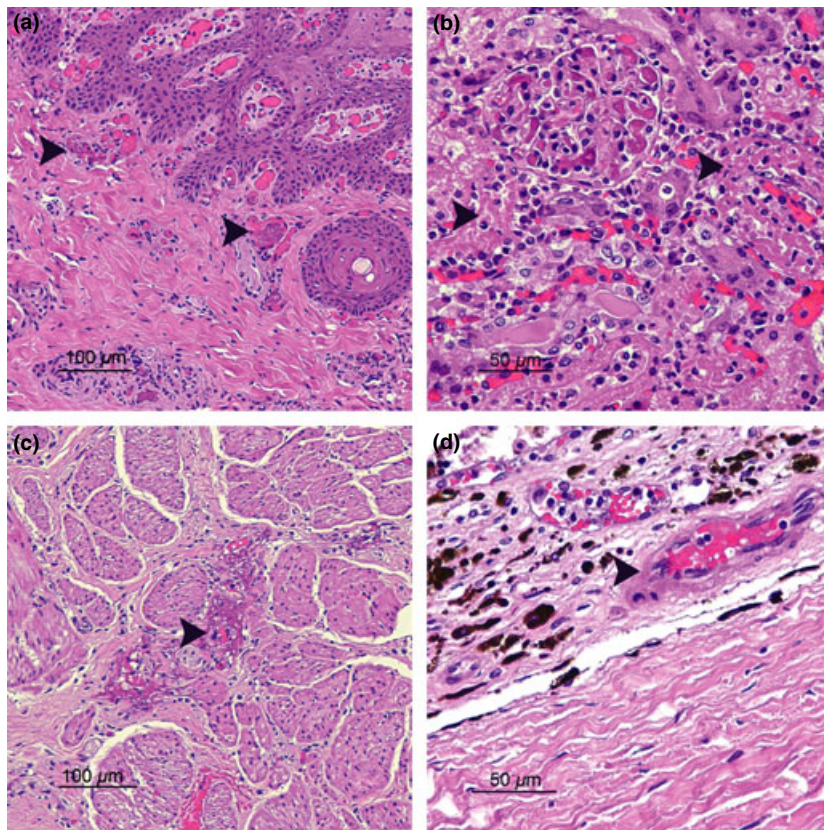


Fig. 2. Septicaemic lesions in a wild boar with swine erysipelas. (a) Skin, marked hyperaemia and fibrin thrombi (arrows); (b) Kidney, fibrin thrombi in glomerular capillaries, tubular necrosis (arrows) with mild lymphocytic interstitial nephritis; (c) Urinary bladder, fibrinoid necrosis of small blood vessels with intravascular bacterial clumps (arrow); and (d) Choroid, fibrinoid necrosis of small blood vessel (arrow). HE stain.

disseminated intravascular coagulation, septic fibrinous microthrombi and vasculitis with swollen endothelial cells invaded by bacteria, along with some leucocytic infiltration and marked fibrinoid necrosis of the vessel walls, intramural haemorrhages, and perivascular fibrin extravasation and haemorrhages. These lesions were especially remarkable in the kidneys, the urinary bladder and on the skin (Figs 2a, b and c). In the kidneys, there were fibrin thrombi in the capillaries of all glomeruli, multifocal interstitial haemorrhages and subacute interstitial nephritis with predominantly mononuclear cells. In the lungs, diffuse congestion, marked interstitial lymphocytic infiltration, thrombosis in small vessels and oedema in the alveoli were the main findings. A few mild mononuclear inflammatory infiltrates were detected in the myocardium, and there were a few foci of fibrinohaemorrhagic necrosis in the spleen. Bilaterally, the ocular lesions in one of the 3-month-old wild boars were consistent with septicaemia, characterized by marked diffuse corneal oedema, diffuse subacute mild panuveitis with mainly mononuclear cells, lymphocytes and plasma cells, and marked fibrinoid vasculitis (Fig. 2d). A circumferential cortical cataract with Morgagnian globules was

also present in both eyes. Gram-stained sections of the urinary bladder, kidneys and ocular globe confirmed the presence of Gram-positive bacteria in the lumen of the vessels and within the cytoplasm of endothelial cells.

Bacterial isolation and identification

A pure growth of tiny grey, alpha-haemolytic, catalase-negative, oxidase-negative colonies consistent with *E. rhusiopathiae* was cultured from all samples (lung, spleen, brain, liver, kidney and heart) taken from all four animals studied, as well as from the carpal synovial membrane of the 1-year-old boar with proliferative arthritis. Microscopic observation showed Gram-positive coccobacilli. These bacteria were identified as *E. rhusiopathiae* using API Coryne[®] galleries.

Antibody detection

In the serum samples from the four dead wild boars, antibodies against *E. rhusiopathiae* were only detected in the 1-year-old male boar with polyarthritis. Of the nine

live adults tested for antibodies, four (including an adult male with polyarthritis) were positive.

Discussion

Although serological studies indicate that at least 5% of free-ranging wild boars have had contact with *E. rhusiopathiae* in Spain (Vicente et al., 2002; Closa-Sebastià et al., 2011), to date, no complete lesional studies of clinical cases of SE in wild boar have been carried out. This article describes an outbreak of SE affecting wild boars in a Mediterranean area. Clinical signs were not observed in any of the animals prior to death, and lesions were consistent with the acute form of the disease in the three 3-month-old wild boars examined and with the chronic form (with proliferative polyarthritis) in the 1-year-old boar. Both macroscopic and microscopic lesions were similar to those described in domestic pigs (Wood and Henderson, 2006). The absence of the characteristic cutaneous lesions ('diamond-skin' lesions) previously described in SE could be due to the acute development of the disease in these wild boars, because these lesions appear as early as the second day (but usually by the third day) after exposure to the microorganism (Wood and Henderson, 2006). These skin lesions were not detected in the rest of the animals on the farm, although if present they would probably have been difficult to see because of the boars' thick hair coat.

Ocular lesions, as seen in one of the 3-month-old wild boars, have never previously been described in cases of SE. In human medical literature, a recent case of bilateral endogenous endophthalmitis was associated with infection by *E. rhusiopathiae* and is thought to be the first report of *E. rhusiopathiae* causing this type of lesion (Elvy et al., 2008). In veterinary literature, two such cases have been described: a horse with bilateral uveitis (Seahorn et al., 1989) and a calf with purulent panophthalmitis with cataracts and focal retinal detachment (Kiluge and Perl, 1992). However, in both of these cases, the animals suffered mixed infections of *E. rhusiopathiae* and *Streptococcus* sp., and the role of *E. rhusiopathiae* in these ocular lesions was not totally clarified. In our case, the presence of vasculitis in the uveal tissue, as seen in other tissues, and the detection of Gram-positive coccobacillus in the vessels suggest that these bacteria were involved as the aetiological agent of the lesions. Corneal oedema occurs under three circumstances, which are not mutually exclusive: corneal ulceration, corneal endothelial dysfunction and vascular leakage from corneal neovascularization (Peiffer et al., 1999). The lack of any peripheral vascularization or evidence of corneal epithelial damage suggests, in our case, that a corneal endothelial injury is the most likely reason for the diffuse corneal oedema. However,

the endothelial layer was not present in the slides, and the mild degree of autolysis prevented us from differentiating between artefactual separation and genuine disappearance.

In our study, antibodies were only detected in the dead 1-year-old boar with lesions consistent with the chronic form of the disease. Three weeks after the beginning of the outbreak, nine of the adults were tested for antibodies, of which four resulted positive. Only one of these animals showed clinical signs of possible active infection with arthritis, but no attempt was made to isolate the bacteria from the joints and the diagnosis remains presumptive. The prevalence of antibodies against *E. rhusiopathiae* before the outbreak in the farm was not known, and so we were unable to differentiate between recent or past contact with the bacteria.

Many of the predisposing factors that may have predisposed these animals to an outbreak of SE such as poor hygienic conditions, extreme temperatures and high rates of parasite infestation (Wood and Henderson, 2006) were present on this farm. Wild boar behaviour such as bathing, which helps control parasites and thermoregulation (Rossell et al., 2001), is probably another risk factor favouring transmission of the infection. It is known that *E. rhusiopathiae* resists for a long time in aquatic environments (Wang et al., 2010), so these communal bathing areas might be important sources of infection.

The appearance of outbreaks of SE on wild boar farms could affect the prevalence of SE in nearby pig farms. The possibility of transmission will be especially high in extensive farms with poor containment measures and in which both wild boar and pigs share the same terrain (Parra et al., 2003). Further surveys aimed at examining whether this pathogen is carried by apparently healthy farmed wild boars, and freshly captured/hunted boars in the wild will help clarify the role of the wild boar as a possible reservoir for this infectious agent.

The presence of wild boars with SE could also represent a hazard for certain human groups (farm workers, hunters, butchers, veterinarians and even by taxidermists). Human infection can arise from contact with infected animals, their secretions or with contaminated material used for carcass (meat) processing (Wood, 1975). The penetration of this microorganism usually occurs through a cut in the skin (McGinnes and Spindle, 1934), although infections caused by the ingestion of contaminated food have also been described (Hunter, 1975).

We can conclude that the lesions found in the studied wild boars with SE did not differ from the acute form of the disease known in domestic pigs, where sudden death and cutaneous erythema are the most common outcomes. However, this study also provides a detailed pathologic description of this disease in farmed wild boars and

represents the first time that *E. rhusiopathiae* has been associated with ocular lesions in suid species.

Acknowledgement

We thank Dr. Brian Wilcock (OVC; University of Guelph) for a thorough revision of the ocular pathology. R. Velarde is supported by the sub-programme *Personal Técnico de Apoyo* of the MICINN (Spain) and the European Social Fund. D. Risco is supported by the programme *Formación del Profesorado* (FPU) of the Spanish Ministry of Education.

References

- Brooke, C.J., and T.V. Riley, 1999: *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J. Med. Microbiol.* 48, 789–799.
- Closa-Sebastià, F., E. Casas-Díaz, R. Cuenca, S. Lavín, G. Mentaberre, and I. Marco, 2011: Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *Eur. J. Wildl. Res.* (doi 10.1007/s10344-010-0491-9).
- Conklin, R.H., and J.H. Steele, 1979: *Erysipelothrix* infections. In: Steele, J.H. (ed.), *CRC Handbook. Series in Zoonoses*, pp. 327–337. CRC press, Boca Raton.
- Elvy, J., I. Hanspal, and P. Simcock, 2008: A case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing bilateral endogenous endophthalmitis. *J. Clin. Pathol.* 61, 1223–1224.
- Gortazar, C., P. Acevedo, F. Ruiz-Fons, and J. Vicente, 2006: Disease risks and overabundance of game species. *Eur. J. Wildl. Res.* 52, 81–87.
- Hunter, D., 1975: *The Diseases of Occupations*. English University Press, London.
- Kiluge, J.P., and S. Perl, 1992: *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicaemia-polyserositis and streptococcal encephalitis in a calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 196–197.
- Laber, K.E., S.A. Bingel, J.A. Goodrich, A.C. Smith, and M.M. Swindle, 2002: Biology and diseases of swine. In: Fox, J.G., L.C. Anderson, F.M. Loew, and F. Quimby (eds), *Laboratory Animal Medicine*, pp. 956–1005. Department of Comparative Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston.
- Lipowski, A., 2003: European wild boar (*Sus scrofa* L.) as a reservoir of infectious diseases for domestic pigs. *Med. Weter.* 59, 861–863.
- McGinnes, G.F., and F. Spindle, 1934: Erysipeloid condition among workers in a bone button factory due to the bacillus of swine erysipelas. *Am. J. Public Health* 24, 32–35.
- Okolo, M.I.O., 1986: Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from apparently healthy pigs reared under intensive and free range systems of management. *Microbios* 47, 29–35.
- Parra, A., P. Fernández-Llario, A. Tato, J. Larrasa, A. García, J.M. Alonso, M. Hermoso De Mendoza, and J. Hermoso De Mendoza, 2003: Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet. Microbiol.* 97, 123–133.
- Peiffer, R.L., B.P. Wilcock, R.R. Dubielzig, J.A. Render, and H.E. Whiteley, 1999: Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology. In: Gelatt K.N. (ed.), *Veterinary Ophthalmology* pp. 355–425. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Rossell, C., P. Fernández-Llario, and J. Herrerros, 2001: Jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus 1758). *Galemys* 13, 1–25.
- Seahorn, T.L., G.W. Brumbaugh, G.K. Carter, and R.L. Wood, 1989: *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia in a horse. *Cornell Vet.* 79, 151–156.
- Takahashi, T., T. Sawada, and M. Muramatsu, 1987: Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. *J. Clin. Microbiol.* 25, 536–539.
- Vicente, J., L. León-Vizcaino, C. Gortázar, M.J. Cubero, M. González, and P. Martín-Atance, 2002: Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, 649–652.
- Wang, Q., B.J. Chang, and T.V. Riley, 2010: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Microbiol.* 140, 405–417.
- Wood, R.L., 1975: *Erysipelothrix* infection. In: Hubbert, W.T., W.F. McCulloch, and P.R. Scurrenberger (eds), *Diseases Transmitted from Animals to Man*, pp. 271–281. Charles C. Thomas Limited, Springfield.
- Wood, R.L., and L.M. Henderson, 2006: Erysipelas. In: Straw, B.E., J.J. Zimmerman, S. D’Allaire, and D.J. Taylor (eds), *Diseases of Swine*, pp. 629–639. Iowa State University Press, Ames.
- Yamamoto, K., M. Kijima, T. Takahashi, H. Yoshimura, O. Tani, T. Kojyou, Y. Yamawaki, and T. Tanimoto, 1999: Serovar, pathogenicity and antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from farmed wild boars (*Sus scrofa*) affected with septicemic erysipelas in Japan. *Res. Vet. Sci.* 67, 301–303.

5.2 Brote mortal de pasterelosis septicémica en una población de jabalíes del suroeste de España. (*Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in wild boar (Sus scrofa) population from southwest Spain*).

Pasteurella multocida (*P. multocida*) es un patógeno bacteriano que afecta a gran variedad de especies animales, provocando importantes enfermedades como la septicemia hemorrágica del ganado bovino (Ranjan y cols., 2011). En el cerdo, las enfermedades más importantes ocasionadas por este microorganismo son la rinitis atrófica y las pasterelosis neumónicas, aunque también se han descrito cuadros de pasterelosis septicémica en Asia (Kalorey y cols., 2008; Register y cols., 2012).

La rinitis atrófica progresiva está producida por cepas toxigénicas de *P. multocida*. Esta enfermedad, típica de granjas intensivas, afecta a animales jóvenes que pueden manifestar descargas nasales, estornudos e incluso malformaciones en el hocico (De Jong, 2006). Por su parte, las pasterelosis neumónicas suelen afectar a cerdos en fase de engorde provocando tos, fiebre, inapetencia y depresión (Pijoan, 2006). Ambas enfermedades reducen los índices de crecimiento de los animales afectados provocando importantes pérdidas económicas.

El jabalí es un suido salvaje susceptible a los patógenos que afectan al cerdo doméstico. *Pasteurella multocida* ha sido relacionada con algún brote de rinitis atrófica progresiva en esta especie salvaje; sin embargo, aún no ha sido asociada con brotes de pasterelosis neumónica o septicémica (Soike y cols., 2012). En este artículo se realiza una completa descripción de un brote de pasterelosis septicémica ocurrido en una población de jabalíes, en el que se valoran aspectos lesionales, microbiológicos y epidemiológicos.

El brote tuvo lugar en una finca de unas 1000 hectáreas de superficie que está situada al nordeste de la provincia de Badajoz (España). La finca se encuentra vallada en todo su perímetro y en ella vivían un total de 207 jabalíes al comienzo del brote (resultados del último censo) que cohabitaban con otras especies como el ciervo y el

muflón. Los jabalíes eran alimentados cada tres días con pienso específico que se distribuía en cuatro comederos específicos.

El brote se desarrolló entre los días 23 y 29 de septiembre de 2012. En este periodo los operarios de la finca encontraron un total de 23 jabalíes muertos en zonas cercanas a los comederos mostrando hemorragias nasales (Tabla 9). Los operarios no observaron ningún tipo de sintomatología previa a la aparición de las muertes.

Tabla 9: Número de animales encontrados muertos durante los días en los que transcurrió el brote de pastereiosis septicémica.

	Animales vivos	Animales muertos						Mortalidad (%)
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	
<i>Machos Adultos</i>	45	1	2	2	3	0	0	17.77
<i>Hembras Adultas</i>	81	0	2	2	4	1	1	12.34
<i>No adultos</i>	81	0	1	2	1	0	1	6.17
Total	207	1	5	6	8	1	2	11.11

En tres de estos animales se realizó un estudio histopatológico y microbiológico completo. Para ello, durante las respectivas necropsias se tomaron muestras de los principales órganos que fueron procesadas para su estudio histológico y para su cultivo microbiológico en agar sangre, agar MacConkey y agar chocolate. Las cepas de *P. multocida* obtenidas en los cultivos fueron posteriormente serotipadas mediante la realización de una PCR *multiplex* (Townsend y cols., 2001). Además las cepas fueron genotipadas mediante la realización de un ensayo ERIC-PCR (Versalovic y cols., 1991). Por último se analizó la existencia de resistencias antibióticas en las cepas aisladas.

Los tres animales estudiados (animales adultos de más de año y medio) mostraron lesiones macroscópicas similares, siendo las más destacables la presencia de edema subcutáneo en ciertas áreas del cuello, congestión generalizada en todos los órganos y la presencia de grandes depósitos de fibrina en la cavidad abdominal. Microscópicamente se demostró la presencia de un daño vascular generalizado con congestión, hemorragia y trombosis en todos los órganos estudiados (Imagen 23).

Pasteurella multocida fue aislada como cultivo puro del material procedente de todos los órganos analizados en los tres individuos. Las cepas de *P. multocida* aisladas fueron encuadradas dentro del serotipo B y mostraron el mismo patrón de bandas en el ensayo ERIC-PCR. Todas las cepas resultaron sensibles a los antibióticos valorados.

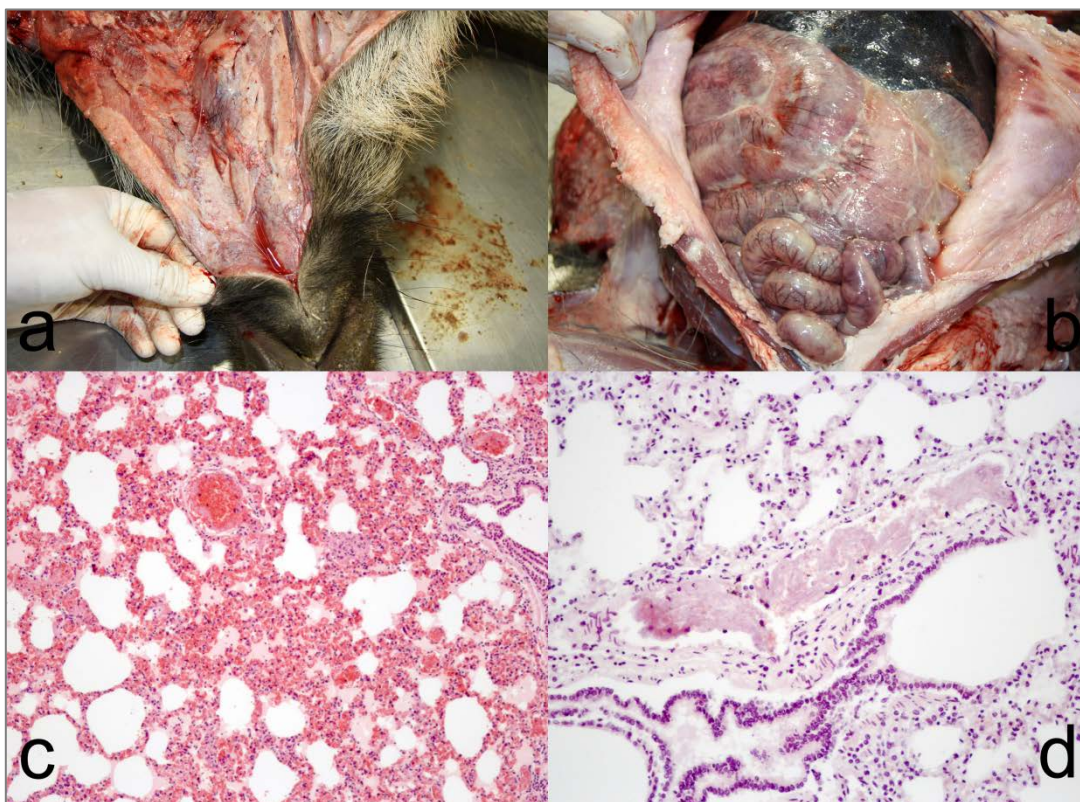


Imagen 23: Jabalí afectado por pasterelosis septicémica. a) Edema subcutáneo en área submandibular. b) Depósitos de fibrina en cavidad abdominal. c) Pulmón. Marcada congestión en vasos sanguíneos y septos alveolares. HE. 4x. d) Pulmón. Trombo en el interior de vaso sanguíneo. HE. 20x.

Estos resultados confirmaron la existencia de un brote de pasterelosis septicémica en esta población de jabalíes. Esta enfermedad ha sido descrita en otras especies como la bovina (Kalorey y cols., 2008). Además, esporádicamente se han declarado algunos brotes en cerdo doméstico (Mackie y cols., 1992; Cameron y cols., 1996). Sin embargo, su aparición en Europa es extremadamente rara, ya que hasta la fecha, sólo se ha publicado un brote de esta enfermedad en porcino (Soike y cols., 2012).

Las cepas de *P. multocida* obtenidas durante el estudio pertenecieron al serotipo B, que precisamente es el que más comúnmente se ha asociado al desarrollo de pasterelosis septicémicas (Townsend y cols., 1998b). El cuadro clínico y lesional encontrado en los jabalíes infectados por estas cepas fue muy similar a los descritos previamente en su pariente doméstico, con muertes repentinas afectando a todas las edades, edema subcutáneo, congestión generalizada y depósitos de fibrina.

La mortalidad en este brote fue del 11.11 % estando este valor dentro de los parámetros descritos en brotes previos de esta enfermedad en cerdo doméstico (5-40 %) (Register y cols., 2012). Aunque en el último brote de pasterelosis septicémicas descrito en Europa se observan mortalidades en varias especies (Soike y cols., 2012), en este caso parece que el brote afectó exclusivamente al jabalí, no observándose mortalidades en las poblaciones de ciervos, gamos o muflones. Estos animales pueden suponer un reservorio potencial de *P. multocida* tipo B para el jabalí, aunque su implicación en el brote deberá ser confirmada con más estudios.

Por otra parte, las abundantes precipitaciones registradas los días previos al brote podrían haber desencadenado este proceso ya que este tipo de brotes han sido comúnmente relacionados con factores ambientales como las precipitaciones abundantes (Carter y cols., 1989).

Tres días después de registrar la primera muerte los animales comenzaron a recibir un tratamiento antibiótico con tetraciclina en el alimento a una concentración de 300 ppm. Este antibiótico es usado con frecuencia para el tratamiento de este tipo de brotes, y aunque la vía de elección en un brote activo sería la parenteral (Register y cols., 2012), la dificultad que conlleva el manejo de estos animales hizo inviable esa opción, siendo el antibiótico suministrado en el pienso. Tras tres días con el tratamiento antibiótico no se registraron más bajas en la población.

Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
25(6) 791–794
© 2013 The Author(s)
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1040638713504411
jvdi.sagepub.com

David Risco,¹ Pedro Fernández-Llario, Jesús M. Cuesta, Waldo L. García-Jiménez, María Gil, Pilar Gonçalves, Remigio Martínez, Luis Gómez, Alfredo García, Joaquín Rey, Miguel Hermoso de Mendoza, Javier Hermoso de Mendoza

Abstract. *Pasteurella multocida* is a common pathogen of swine that causes specific diseases with great economic impact. However, the importance of this pathogen in wild boar is still unknown. In the current work, an outbreak of systemic pasteurellosis in wild boar with a high mortality rate is described. A total of 23 wild boar of all ages were found dead over a 5-day period on a game estate in southwest Spain (11.11% mortality). Three animals were necropsied and showed subcutaneous edema, a generalized congestion, and fibrin deposits in the peritoneal cavity. Hemorrhages, general congestion, and intravascular thrombosis were microscopically observed. *Pasteurella multocida* type B was isolated from all of the studied organs. Outbreaks of systemic pasteurellosis have been described in domestic pigs from Asia and Australia, but not to date in Europe. This outbreak suggests that systemic pasteurellosis affecting wild boar populations may be an important cause of mortality.

Key words: Outbreak; *Pasteurella multocida*; septicemia; systemic pasteurellosis; wild boar.

Pasteurella multocida is a nonmotile Gram-negative rod or coccobacillus with 5 recognized capsular serovars: A, B, D, E, and F.¹¹ The organism infects a wide range of animal hosts causing important diseases such as hemorrhagic septicemia in cattle, fowl cholera in poultry, and snuffles in rabbit.¹⁰

In pigs, the main diseases produced by *P. multocida* are progressive atrophic rhinitis (PAR) and pneumonic pasteurellosis, although sporadic outbreaks of fatal, acute septicemia attributed to *P. multocida* have also been registered in pigs from several countries in Asia and Australia.^{7,8,15} Progressive atrophic rhinitis is produced by toxigenic *P. multocida* and mainly occurs in intensive farms, affecting animals younger than 3 months with sneezing, nasal and ocular discharges, and low growing rates.⁵

Pneumonic pasteurellosis is one of the most widespread diseases of pigs causing great economic losses.¹¹ *Pasteurella multocida* is rarely a primary agent of pneumonia in pigs, and coinfections with other respiratory disease agents such as *Mycoplasma hyopneumoniae* or Pseudorabies virus (*Suid herpesvirus 1*) are common in swine pneumonic pasteurellosis outbreaks.¹¹ This syndrome mainly affects finishing pigs resulting in coughing, intermittent fever, anorexia, and depression. In acute cases, *P. multocida* may produce abscesses and pleuritis with more severe symptoms such as cyanosis or sudden death.⁹

The domestic pig and the wild boar belong to the same species (*Sus scrofa*) and are thus likely to be susceptible to the same pathogens.¹² The presence of *P. multocida* in wild

boar has been related with cases of PAR in young animals from Germany.¹³ However, to the authors' knowledge, outbreaks of pneumonic pasteurellosis or systemic pasteurellosis have not been described in wild boar. The current study describes an outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar population from southwest Spain, including epidemiological, pathological, and microbiological features of the outbreak.

The outbreak occurred in a wild boar population located in Villar del Rey (northeast Badajoz Province, Extremadura, southwest Spain). This area has a continental thermo-Mediterranean climate, with hot dry summers and mild and moderately wet winters. The vegetation consists mainly of scrubland (genus *Cistus*; e.g., *C. ladanifer*) and evergreen cork oak forests (*Quercus suber*).

The home range of this population is surrounded by a fence that encloses approximately 1,000 ha where wild boar share the habitat with red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and mouflon (*Ovis musimon*). Supplementary food (mainly corn) is provided to the wild boar every 3 days across the year in 4 feeders strategically distributed throughout the estate. When the outbreak occurred, approximately

From the Animal Health Department, Veterinary Faculty, Extremadura University, Cáceres, Spain.

¹Corresponding Author: David Risco Pérez, Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Avda. Universidad s/n, CP. 10003, Cáceres, Spain. riscope@unex.es

Table 1. Number of animals found daily during the outbreak, and final mortality rates.*

	Live animals	Dead animals						Mortality (%)
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	
Adult males	45	1	2	2	3	0	0	17.77
Adult females	81	0	2	2	4	1	1	12.34
Nonadult	81	0	1	2	1	0	1	6.17
Total	207	1	5	6	8	1	2	11.11

* Animals counted in the last census (July 2012) are shown in the "Live animals" column. Mortality rates are calculated for adult males, adult females, and nonadult animals. Day 1 was September 23, 2012.

207 wild boar were living on the estate. The total number of animals (July 2012 census) was estimated by counting simultaneously the number of wild boar eating at each of the 4 feeders. The sex and age of counted animals are detailed in Table 1.

In the week beginning September 23, 2012, a total of 23 wild boar presenting a profuse epistaxis were found dead, close to the feeders, by the farm workers. The number of dead animals found each day is shown in Table 1. No clinical signs were observed, and no important health problems had been detected on the farm prior to the deaths.

Three of the dead animals were studied. A postmortem examination was performed, and multiple tissue samples were processed for histology, following standard procedures, and stained with hematoxylin and eosin.^a Tissue samples from liver, spleen, kidney, and lung, collected during necropsy, were cultured on blood agar,^b chocolate agar,^b and MacConkey agar.^c The plates were incubated for at least 24 hr at 37°C in aerobic conditions. Isolates obtained were identified using standard methods for phenotypic characterization.¹ Isolates identified as *P. multocida* were confirmed and serotyped using a specific multiplex polymerase chain reaction (PCR)¹⁴ with a commercial *Taq* enzyme.^d The DNA from the isolates was extracted using a commercial kit.^e The PCR products were separated by 1% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining under ultraviolet light. The *P. multocida* isolates were genotyped using enterobacterial repetitive insertion consensus-PCR (ERIC-PCR) as previously described.¹⁶ The antimicrobial susceptibility of the *P. multocida* isolates (ampicillin, amoxicillin, tetracycline, enrofloxacin, gentamicin, chloramphenicol, and trimethoprim-sulfamethoxazole) was tested using a standardized disk diffusion method.⁴

The 3 animals under study (2 females approximately 5 and 3 years old, and 1 male approximately 1.5 years old) showed similar gross lesions. The animals showed good body condition with thick subcutaneous fat layer, subcutaneous edema in low areas of the neck (Fig. 1A), generalized congestion and hemorrhages in all organs, and a great amount of fibrin in the peritoneal cavity (Fig. 1B). Microscopically, vascular damages with presence of hemorrhages, general congestion (Fig. 1C), and intravascular thrombosis (Fig. 1D) were observed in all the studied organs.

A pure growth of grayish, nonhemolytic, oxidase-positive colonies consistent with *P. multocida* were obtained from all samples (lung, spleen, liver, kidney) of each animal, after culture on blood agar and chocolate agar (12 isolates). The MacConkey agar plates showed no bacterial growth. Microscope observation of the isolates obtained showed Gram-negative coccobacilli typical of *P. multocida*. The PCR products obtained showed 2 bands (460 bp and 760 bp, respectively) indicating that the 12 *P. multocida* isolates belonged to serovar B. The 12 isolates of *P. multocida* belonged to the same genotype showing the same fingerprint pattern in the ERIC-PCR (Fig. 2). Specific interpretative criteria for porcine *P. multocida* and the antimicrobials examined in the present study are not provided in the standardized methodology used.⁴ Hence, the interpretations were done using the generic criteria.⁴ As no criteria are available for amoxicillin, the criteria for ampicillin⁴ were used. All isolates were found to be sensitive to all antimicrobial agents tested.

In the current work, an outbreak of acute systemic pasteurellosis affecting wild boar has been confirmed. Septicemic disease caused by *P. multocida* is well recognized in cattle and buffalo.⁷ In domestic pigs, sporadic outbreaks have been reported in several countries of the eastern hemisphere,^{2,8,9} being extremely uncommon in Europe where only 1 outbreak has been reported in Germany.¹³

Pasteurella multocida has been previously isolated from wild boar and linked with a case of PAR,⁶ but has not been associated with any outbreak of acute septicemia. The *P. multocida* isolates obtained in the current study were typed as capsular type B, the causal agent of hemorrhagic septicemia.¹⁰ Serovar B is the most prevalent capsular serovar associated with acute systemic pasteurellosis in swine in Vietnam.¹⁵ On the other hand, serovars D and A are the most commonly isolated serovars from pneumonia in pigs.¹¹

The clinical signs and lesions found in these animals were very similar to those previously described in domestic pigs: sudden deaths affecting all ages, with subcutaneous edema, generalized congestion, hemorrhages, and fibrinous deposits in peritoneal cavity.⁸ In the studied outbreak, the estimated mortality rate was 11.11%. The mortality was estimated based on the number of dead wild boar found by estate workers. However, the total number of deaths could be

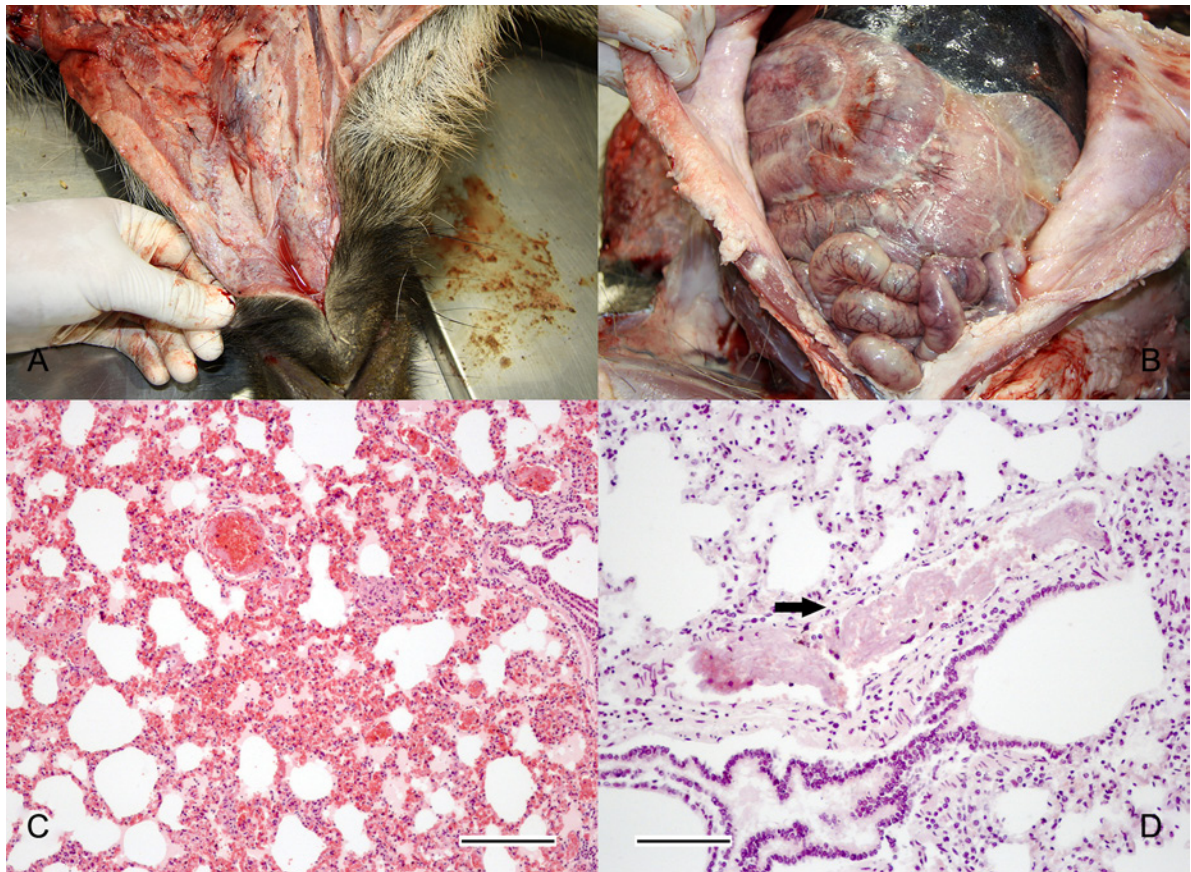


Figure 1. Wild boar (*Sus scrofa*). **A**, subcutaneous edema in submandibular area. **B**, large amounts of fibrin in abdominal cavity. **C**, lungs. Marked congestion in blood vessels and alveolar septa. Hematoxylin and eosin (HE). Bar = 200 μ m. **D**, lungs. Thrombus inside a blood vessel (arrow). HE. Bar = 100 μ m.

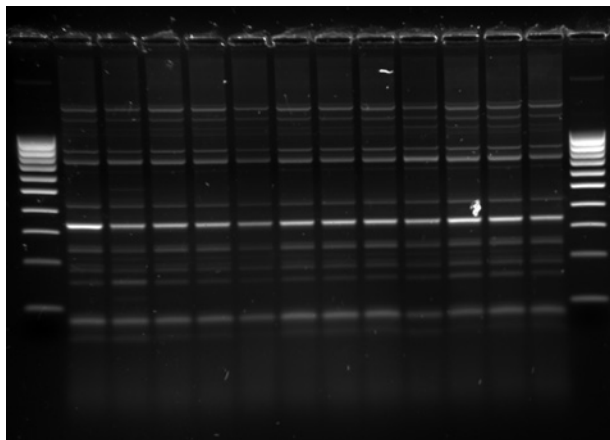


Figure 2. Fingerprint patterns obtained with use of enterobacterial repetitive insertion consensus sequence polymerase chain reaction on 12 *Pasteurella multocida* serovar B isolates.

higher because it is very difficult to recover all carcasses in a big estate and many of them could have been removed quickly by scavengers. The mortality rate in the current outbreak was in agreement with those previously reported in

acute systemic pasteurellosis outbreaks described in domestic pigs, ranging from 5% to 40%.^{7,11}

Although an outbreak of acute systemic pasteurellosis involving different species has been described in Europe,¹³ the current outbreak involved no mortalities in the red deer, fallow deer, or mouflon populations, suggesting that this outbreak was limited to the wild boar population. Some wild species such as roe deer or fallow deer have been suggested as being able to be healthy carriers of *P. multocida* type B.¹³ Thus, the presence of other wild ungulates sharing the habitat with wild boar might be a potential source of *P. multocida*. However, more research would be necessary to determine the primary source of *P. multocida* in this outbreak.

Outbreaks of systemic pasteurellosis have been commonly related with environmental factors, such as abundant precipitations.³ In this sense, the start of this outbreak could have been favored by the extreme wet period that occurred on the estate just when the outbreak was recognized, with rainfall of 45.6 mm between September 23 and 28 (no rain had been registered in the previous 4 weeks).

A therapeutic protocol based on the addition of tetracycline (200 ppm) in food was implemented daily for 10 days,

starting 3 days after the first deaths. The antimicrobial was added in the food due to the difficulty of parenteral application in this kind of species. In addition, the addition of tetracycline to food has been widely recommended as a preventive treatment to pasteurellosis.¹¹ No more dead animals were found 3 days after the beginning of the treatment.

Sources and manufacturers

- a. Isokit, Bio-Optica Milano SpA, Milan, Italy.
- b. Oxoid, Thermo Fisher Microbiology Division, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom.
- c. Scharlau, Barcelona, Spain.
- d. Kapa Taq, Kapa Biosystems, Woburn, MA.
- e. QIAamp DNA Mini kit, Qiagen Ltd., Crawley, United Kingdom.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared that they had no conflict of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España) PS0900513, Regional Government of Extremadura (PDT09A046 and GRU10142) and FEDER. D. Risco has a Formación de Profesorado Universitario (FPU) grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2009-0704).

References

1. Barrow GI, Feltham RKA: 1993, Characters of Gram-negative bacteria. *In: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd ed., pp. 94–164. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
2. Cameron RD, O'Boyle D, Frost AJ, et al.: 1996, An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in a large pig herd. *Aust Vet J* 73:27–29.
3. Carter GR, De Alwis MCL: 1989, Haemorrhagic septicaemia. *In: Pasteurella and pasteurellosis*, ed. Adlam C, Rutter JM, pp. 125–137. Academic Press, London, UK.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): 2008, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—third edition. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
5. De Jong MF: 2006, Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. *In: Diseases of swine*, ed. Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, 9th ed., pp. 577–602. Blackwell, Ames, IA.
6. Kaden V, Teifke JP, Polster U: 2001, Progressive atrophische Rhinitis—Eine seltene Erkrankung beim Schwarzwild (*Sus scrofa scrofa* L 1758) [Progressive atrophic rhinitis—a rare disease in wild boar]. *Eur J Wildl Res* 47:17–25. In German. Abstract in English.
7. Kalorey DR, Yuvaraj S, Vanjari SS, et al.: 2008, PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:459–465.
8. Mackie JT, Barton M, Kettlewell J: 1992, *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. *Aust Vet J* 69:227–228.
9. Pijoan C: 2006, Pneumonic pasteurellosis. *In: Diseases of swine*, ed. Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, 9th ed., pp. 719–726. Blackwell, Ames, IA.
10. Rajeev R, Panda SK, Acharya AP, et al.: 2011, Molecular diagnosis of haemorrhagic septicaemia—a review. *Vet World* 4:189–192.
11. Register KB, Brockmeier SL, de Jong MF, Pijoan C: 2012, Pasteurellosis. *In: Diseases of swine*, ed. Zimmermann J, Karriker LA, Ramirez A, et al., 10th ed., pp. 798–810. Wiley, Hoboken, NJ.
12. Risco D, Llarío PF, Velarde R, et al.: 2011, Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain. *Trans Emerg Dis* 58:445–450.
13. Soike D, Schulze C, Kutzer P, et al.: 2012, Akute Pasteurellose bei Damwild, Rindern und Schweinen in einer region im Osten Deutschlands [Acute pasteurellosis in fallow deer, cattle and pigs in a region of Eastern Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125:122–128. In German. Abstract in English.
14. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, et al.: 2001, Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39:924–929.
15. Townsend KM, O'Boyle D, Phan TT, et al.: 1998, Acute septicemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet Microbiol* 63:205–215.
16. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR: 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823–6831.

5.3 Caso mortal de infección por *Streptococcus suis* asociado con elevadas mortalidades en una población de jabalíes del suroeste de España. (*Fatal case of Streptococcus suis infection associated to high mortality in a wild boar population from south-western Spain*).

Streptococcus suis (*S. suis*) es uno de los patógenos infecciosos más importantes que afectan al sector porcino (Gottschalk y cols., 2000). Las infecciones por este microorganismo dan lugar a gran variedad de síntomas. Así, las estreptococias pueden cursar de manera sobreaguda, provocando la muerte de los individuos afectados sin mostrar ningún síntoma (Higgins y cols., 2006); o con un cuadro subagudo en el que los animales afectados pueden mostrar problemas nerviosos, artritis o neumonía (Staats y cols., 1997).

Streptococcus suis ha sido aislado en gran cantidad de animales aparte del cerdo, entre ellos el jabalí (Seol y cols., 1998; Cloutier y cols., 2003). Sin embargo, las repercusiones que las infecciones por *S. suis* tienen en el estado sanitario de esta especie no son bien conocidas aún. En este artículo se presenta una descripción lesional y microbiológica de una infección mortal por *S. suis* en un jabalí procedente de una explotación en la que además, se registró una alta mortalidad en jabalíes que mostraban una sintomatología similar a la del animal infectado por *S. suis*.

El animal afectado fue hallado en una finca situada al este de la provincia de Badajoz (España). Esta finca abarca unas 700 hectáreas completamente valladas. Según los datos del último censo realizado por los operarios de la finca, aproximadamente unos 700 jabalíes (200 machos adultos, 250 hembras adultas y 250 animales menores de 6 meses) vivían en ella cuando apareció este caso. Estos animales eran diariamente alimentados con un pienso específico repartido en 12 comederos distribuidos por toda la finca.

El animal objeto de estudio, una hembra con aproximadamente 15 días de vida, fue encontrado moribundo en las inmediaciones de uno de estos comederos.

Presentaba sintomatología nerviosa con incoordinación, convulsiones, incapacidad para estar en pie y ceguera. Tras su muerte, el animal afectado se sometió a un estudio completo, en el que se analizaron tanto histológica como microbiológicamente, muestras procedentes de los pulmones, bazo, cerebro e hígado. Las muestras utilizadas para el estudio histológico fueron fijadas en formaldehído y procesadas siguiendo el protocolo habitual. Por su parte, las muestras obtenidas para el estudio microbiológico se sembraron en diferentes medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. Las cepas de *S. suis* obtenidas durante el estudio microbiológico fueron sometidas a un ensayo PCR para determinar su serotipo y la presencia de alguno de los principales factores de virulencia asociados a esta bacteria: factor extracelular, proteínas relacionadas con la muramidasa, hemolisina y arginina deiminasa (Silva y cols., 2006).

Durante la necropsia del animal afectado se observó una congestión generalizada del sistema nervioso central asociada a la presencia de hemorragias en las meninges. Estas lesiones se correspondieron microscópicamente con una meningoencefalitis no supurativa con marcada congestión y edema perivascular. Además, se observaron lesiones neumónicas en lóbulos apicales que al ser visualizadas al microscopio se correspondieron con una bronconeumonía supurativa.

Un cultivo puro de *S. suis* se obtuvo en las muestras procedentes de todos los órganos estudiados que fueron sembradas en agar sangre y agar chocolate. Los cuatro aislamientos resultaron pertenecer al serotipo 2 que es el serotipo más prevalente en países como Francia, Italia o España (Staats y cols., 1997). Además los aislamientos obtenidos de los cuatro órganos presentaban todos los factores de virulencia valorados, lo que sugiere que realmente pertenecen a la misma cepa.

Este trabajo realiza la primera descripción de una infección mortal por *S. suis* en un jabalí que muestra sintomatología nerviosa. Este microorganismo había sido previamente aislado en jabalí, pero sólo en un animal que mostraba una leve neumonía (Higgins y cols., 1997). Los síntomas mostrados por el animal objeto de estudio concuerdan con los descritos previamente en el cerdo doméstico.

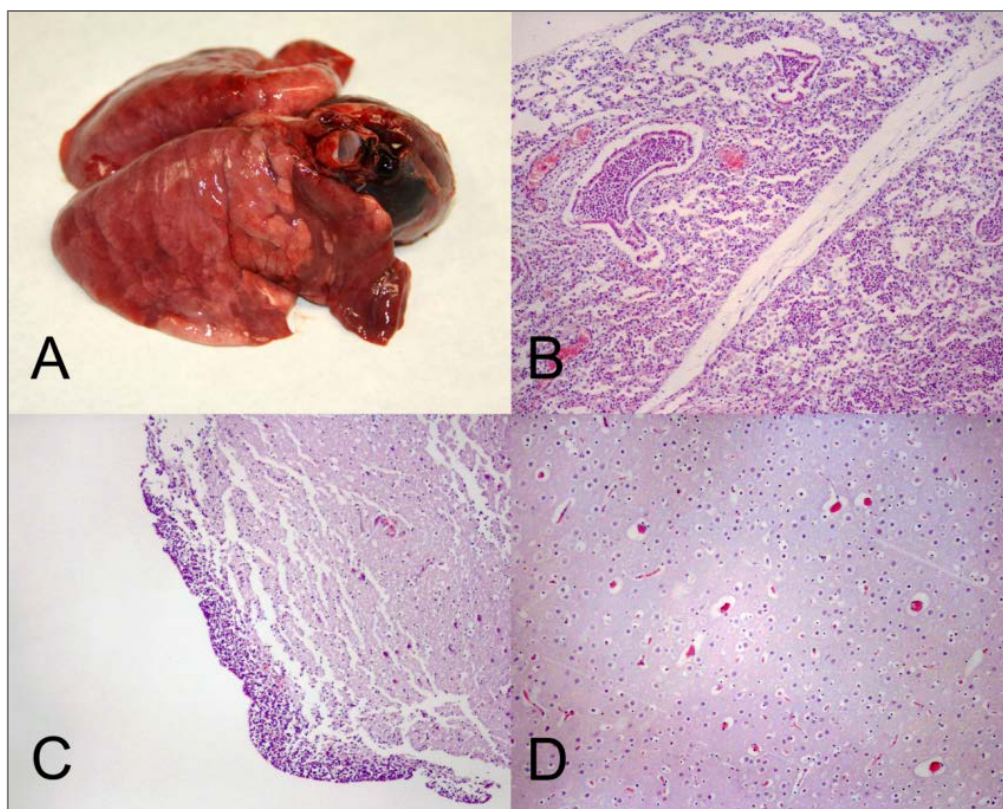


Imagen 24: Lesiones mostradas por jabalí infectado con *S. suis*. A) Lesiones neumónicas en lóbulos apicales de pulmón. B) Bronconeumonía asociada a edema alveolar. HE. 10x. C) Sistema nervioso central. Infiltrado inflamatorio periférico. HE. 20x. D) Sistema nervioso central. Infiltrado inflamatorio perivascular. HE. 20x.

La mortalidad en los brotes ocasionados por *S. suis* puede variar entre el 5 o el 20 % dependiendo del tratamiento aplicado y de la presencia de factores predisponentes (Cloutier y cols., 2003). En las fechas cercanas al hallazgo del animal estudiado los operarios de la finca observaron más animales de unos 15 días de edad mostrando una sintomatología nerviosa similar a la del jabalí bajo estudio. Por otra parte, en el censo realizado al mes siguiente se notó un descenso del 30 % en el número de animales esperados para esa edad. Estos hechos sugieren que *S. suis* pudo provocar la muerte de más animales en esta finca. Sin embargo, desafortunadamente esta circunstancia no pudo ser contrastada, ya que no se pudo recuperar ninguno de los cadáveres, posiblemente porque estos habrían sido rápidamente consumidos por los depredadores o por sus propios congéneres. De este modo, más investigaciones valorando la prevalencia de cepas patógenas de *S. suis* serán necesarias para determinar el impacto de dicho agente en esta población de jabalíes.

1 Running Head: Letters

2

3 Full title: Fatal case of *Streptococcus suis* infection associated to high mortality in a wild boar
4 population from south-western Spain

5

6 D. Risco¹, P. Fernández-Llario¹, J. M. Cuesta¹, W. L. García-Jiménez¹, P. Gonçalves¹, M. Gil, R.
7 Martínez¹, A. García¹, R. Rosales², L. Gómez¹, J. Hermoso de Mendoza¹

8

9 ¹Red de Grupos de Investigación en Recursos Faunísticos, Facultad de Veterinaria de
10 Cáceres, Universidad de Extremadura, Avd de la Universidad sn, CP 10003, Cáceres, Spain.

11 ²Bacteriology Department, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, AHVLA-
12 Weybridge, KT15 3NB, Addlestone, Surrey, United Kingdom.

13

14 Corresponding Author: David Risco Pérez, Unidad de Patología Infecciosa, Facultad de
15 Veterinaria de Cáceres, Avda. Universidad s/n, CP. 10003 Cáceres, Spain. E-mail address:
16 driscope@gmail.es

17

18 *Streptococcus suis* is a reported pathogen in wild boar. However, its sanitary impact for
19 this species is still unknown. This article reports for the first time a detailed description of a fatal
20 case of septicemia by *Streptococcus suis* affecting a young wild boar that showed severe
21 meningitis and pneumonic lesions.

22 In recent decades, the number of wild boar living in Europe has risen considerably. For
23 example, in countries like Spain wild boar hunting is a significant business. Therefore, estate
24 managers try to maintain an overabundance of wild boar population implementing intensive
25 management measures like fencing or supplementary feeding (Gortázar et al. 2006).

26 Higher densities in wild boar populations may pose increased risks for transmission of infectious
27 diseases (Ruiz-Fons et al. 2008). Wild boar is susceptible to important pathogens that infect pigs
28 and other animal species. In this sense, wild boar has been described as an important reservoir
29 of infectious agents like *Mycobacterium bovis* or Aujeszky's Disease Virus (Hermoso de Mendoza
30 et al. 2006).

31 The presence of such pathogens in wild boar may also pose an ecological concern.
32 Thus, it is known that some infectious agents like *Erysipelothrix rhusiopathiae* or *Pasteurella*
33 *multocida* may cause disease in wild boar, leading to high mortality rates (Risco et al. 2011, Risco
34 et al. 2013). However, the clinical consequences of other important pig's pathogens like
35 *Streptococcus suis*, are still unknown.

36 In the current work, we present a complete microbiological and pathological study of a
37 fatal case of *S. suis* infection in a young wild boar. The affected animal belonged to a population
38 located in Llerena (Extremadura, south-western Spain). This area has a continental thermo-
39 Mediterranean climate, with hot dry summers and mild and moderately wet winters.

40 The home range of this population is bounded by a fence that encloses about 700 ha
41 where wild boar share the habitat with red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus*
42 *capreolus*). Supplementary food (mainly fodder) is provided to wild boar daily in twelve feeders
43 strategically distributed throughout the estate. At the time of the outbreak, approximately 700 wild
44 boar were living in the estate (approximately 200 adult males, 250 adult females and 250 piglets).
45 These data were collected during the last census carried out in the estate (April 2013), which is

46 estimated monthly by simultaneously counting the number of wild boar eating at each of the
47 twelve feeders.

48 The affected wild boar (a young female of approximately 15 days old) was near death,
49 close to a feeder on 17 April 2013. At this moment, the animal presented nervous symptoms
50 including incoordination, convulsions, inability to stand and blindness. A complete post-mortem
51 examination carried out within 24 hours after death was carried out. The animal presented a good
52 body condition with a thick layer of subcutaneous fat, generalized congestion in the central
53 nervous system associated with meningeal hemorrhages affecting the ventrocaudal regions of
54 the brain and cerebellum and lobular pneumonia affecting the apical lobes of the lungs (Fig. 1a).

55 Multiple tissue samples were processed for histopathology following standard procedures
56 and stained with hematoxylin and eosin. The microscopic analysis revealed a suppurative
57 bronchopneumonia associated with alveolar and airway edema (Fig. 1b). Interstitial edema was
58 also present in the lungs. In addition, neutrophilic meningitis (Fig. 1c), non-suppurative
59 encephalitis with marked congestion and perivascular edema (Fig. 1d) were observed. The
60 remaining organs did not show any remarkable lesions.

61 Tissue samples from liver, spleen, brain and lung collected during necropsy were
62 cultured on blood agar, chocolate agar, and MacConkey agar. The plates were incubated for 24
63 hours at 37°C in aerobic conditions. A pure growth of greyish, alpha-haemolytic, catalase-
64 negative colonies formed by gram-positive cocci was obtained from all organs (lung, spleen,
65 brain, liver) cultured on blood agar and chocolate agar, whereas MacConkey agar cultures
66 showed no bacterial growth. Isolates obtained from all the organs tested were identified as *S. suis*
67 using API 20 STREP® galleries (BioMérieux, France).

68 In order to determine the serotype of the *S. suis* isolates and to assess the presence of
69 the main virulence factors, including the extracellular factor (ef), muramidase-released protein

70 (mrp), suylisin (sly) and arginine deiminase (argd), a specific multiplex-PCR was carried out as
71 previously described (Silva et al. 2006). All of them belonged to serotype 2 that is the most
72 prevalent serotype in some European countries including France, Italy or Spain (Staats et al.
73 1997). In addition, isolates obtained from the organs tested were positive for all of the virulence
74 factors tested (ef, mrp, sly and argd). It suggested that isolates from different organs belonged to
75 the same strain.

76 Results obtained in the pathological and microbiological assessment confirmed a fatal
77 case of *S. suis* infection in wild boar. This microorganism has been repeatedly isolated from wild
78 boar and associated with sporadic cases of pneumonic lesions in these animals (Higgins et al.
79 1997, Seol et al. 1998). However, to the authors' knowledge this is the first report of a fatal *S. suis*
80 infection in wild boar showing septicemia and nervous signs. The affected animal exhibited
81 clinical signs and lesions similar to those previously described in acute cases of streptococcosis
82 affecting domestic pigs (nervous signs, septicemia and pneumonia) (Higgins and Gottschalk
83 2006).

84 In pig farms, *S. suis* acute infections may lead to mortality rates that can vary between 5
85 to 20 % depending on the treatment applied and the presence of predisposing factors (Cloutier et
86 al. 2003). Around the same time that this case occurred, some more animals of about 15 days of
87 age were observed exhibiting incoordination, disorientation and blindness. These animals were
88 unable to follow their mothers and were seen consistently falling and colliding. In addition, a
89 decrease of about 30% in the expected number of wild boar of about one month of age was noted
90 in the census carried out in May. This suggests that more animals might have died as a result of
91 *S. suis* infection. Unfortunately, we were unable to recover additional carcasses to confirm the
92 presence of *S. suis*, in part due to the fact that small carcasses are quickly consumed by
93 predators or other adult wild boars. In this context, the true impact of *S. suis* infections at this

94 estate remains unknown. Thus, more research assessing the prevalence of virulent strains of *S.*
95 *suis* in this wild boar population will be necessary to elucidate its potential impact in wild boar
96 health status.

97 **Literature Cited**

- 98 Cloutier G, D'allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M. 2003.
99 Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without
100 clinical disease. *Vet Microbiol* 97: 135-151.
- 101 Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J. 2006. Disease risks and overabundance of
102 game species. *Eur J Wildl Res* 52: 81-87.
- 103 Hermoso De Mendoza J, Parra A, Tato A, Alonso JM, Rey JM, Peña J, García-Sánchez A,
104 Larrasa J, Teixidó J, Manzano G, Cerrato R, Pereira G, Fernández-Llario P, Hermoso De
105 Mendoza M. 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus*
106 *elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev Vet*
107 *Med* 74: 239-247.
- 108 Higgins R, Gottschalk M. 2006. Streptococcal Diseases. In: *Diseases of swine*, Straw BE,
109 Zimmerman JJ, D'allaire S, Taylor DJ, editors. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. pp.
110 769-784.
- 111 Higgins R, Lagacé A, Messier S, Julien L. 1997. Isolation of *Streptococcus suis* from a young wild
112 boar. *Canadian Veterinary Journal* 38: 114.
- 113 Risco D, Fernández-Llario P, Cuesta JM, García-Jiménez WL, Gil M, Gonçalves P, Martínez R,
114 Gómez L, García A, Rey J, Hermoso De Mendoza M, Hermoso De Mendoza J. 2013.
115 Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from
116 southwest Spain. *J Vet Diagn Investig* 25: 791-794.
- 117 Risco D, Llario PF, Velarde R, García WL, Benítez JM, García A, Bermejo F, Cortés M, Rey J, De

- 118 Mendoza JH, Gómez L. 2011. Outbreak of Swine Erysipelas in a Semi-Intensive Wild
119 Boar Farm in Spain. *Trans Emerg Dis* 58: 445-450.
- 120 Ruiz-Fons F, Segalés J, Gortázar C. 2008. A review of viral diseases of the European wild boar:
121 Effects of population dynamics and reservoir rôle. *Vet J* 176: 158-169.
- 122 Seol B, Naglic T, Vrbanac I. 1998. Isolation of *Streptococcus suis* capsular type 3 from a young
123 wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec* 143: 664.
- 124 Silva LMG, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P. 2006. Virulence-
125 associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet Microbiol* 115: 117-
126 127.
- 127 Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. 1997. *Streptococcus suis*: Past and present.
128 *Vet Res Commun* 21: 381-407.
- 129
- 130

131 **Figure 1.** Wild boar (*Sus scrofa*) **A**, Lung. Focal pneumonia in cranial lobes. **B**, Lung.
132 Bronchopneumonia associated to alveolar and interstitial edema. Hematoxilin eosin **C**, Central
133 nervous system. Peripheral inflammatory infiltrate. Hematoxilin eosin. **D**, Central nervous system.
134 Perivascular edema. Haematoxilin eosin.

135

136

137

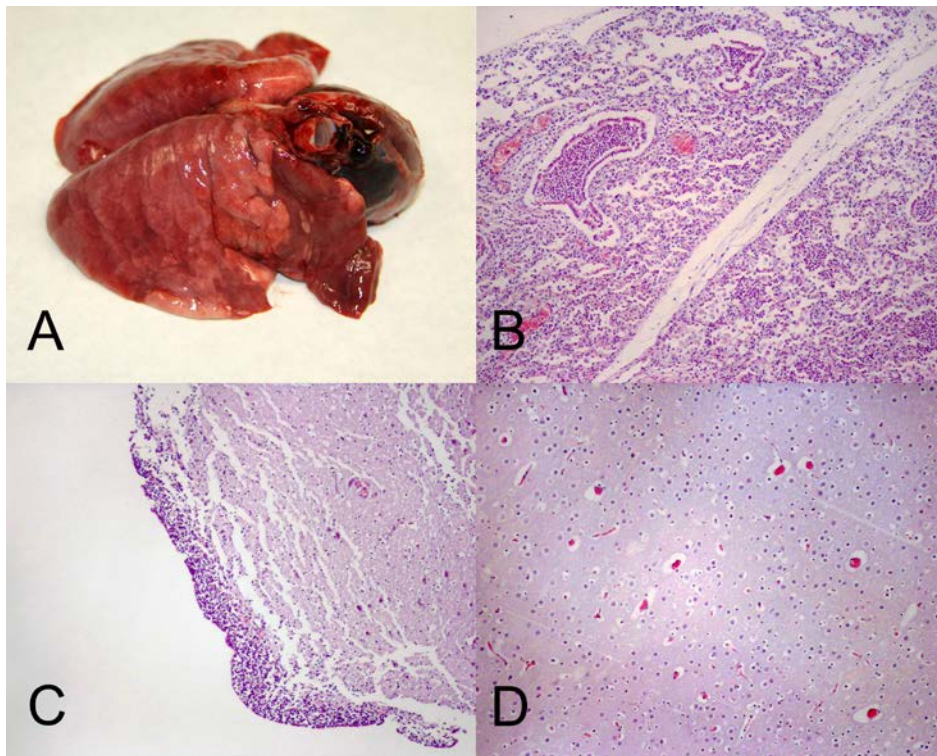
138

139

140

141

Figure 1



5.4 Caso de epidermitis exudativa en un jabalí joven perteneciente a una finca de caza en España. (*A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate*).

La epidermitis exudativa es una enfermedad del cerdo que produce importantes pérdidas económicas en las explotaciones afectadas (Wegener y cols., 2006). Esta enfermedad está producida por cepas virulentas de *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*). Sin embargo, la presencia de estas bacterias en la piel del animal no es suficiente para desencadenar la enfermedad, siendo necesaria la presencia de otros factores predisponentes como heridas en la piel, deficiencias nutricionales o coinfecciones con otros agentes como el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) o el parvovirus porcino (PPV) (Whitaker y cols., 1990; Aarestrup y cols., 1997; Watrang y cols., 2002).

Los brotes de esta enfermedad suelen aparecer en granjas de porcino intensivo afectando, sobre todo, a cerdos jóvenes (entre 5 y 35 días de edad). En dichos brotes se pueden observar diferentes formas clínicas (Wegener, 1992). Las formas sobreagudas o agudas de la enfermedad afectan principalmente a cerdos lactantes o recién destetados y cursan con una epidermitis generalizada, que puede dar lugar a deshidratación y muerte de los animales afectados. Al inicio de la enfermedad simplemente se observan zonas de piel enrojecidas en diferentes partes del cuerpo. Sin embargo, conforme avanza el cuadro clínico van apareciendo exudados grasos de coloración oscura que se extienden por todo el cuerpo y que van acompañados de la presencia de úlceras, habitualmente halladas alrededor de la boca o en la zona de las pezuñas (Wegener y cols., 2006; Ginn y cols., 2007). Por su parte, las formas crónicas de la enfermedad suelen afectar a animales de mayor edad y cursan con un cuadro lesional más leve y que afecta a áreas más pequeñas del cuerpo. En este tipo de cuadros se suelen observar abscesos subcutáneos, necrosis en las orejas y el rabo, o poliartritis (Wegener y cols., 2006).

Debido a que el cerdo y el jabalí son susceptibles a los mismos patógenos, las infecciones por *S. hyicus* podrían también tener repercusiones clínicas en este último. Sin embargo, hasta la fecha ningún caso de epidermitis exudativa había sido declarado en jabalíes. En este trabajo se presenta un caso clínico de epidermitis exudativa en un jabalí describiendo las características patológicas y microbiológicas del caso.

El animal afectado, una hembra de unos 6 meses de edad, fue hallado muerto en una finca situada al este de la provincia de Toledo (España). La finca, vallada en su totalidad, abarca una superficie de 2000 hectáreas en las que vivían aproximadamente 350 jabalíes cuando se detectó el caso. Estos animales eran alimentados artificialmente en los meses de verano mediante el suministro de un pienso específico, mientras que el resto del año, aprovechaban los recursos naturales disponibles en la finca.

Durante la inspección externa del animal se observó la presencia de exudados y úlceras en zonas de la piel situadas alrededor de la boca y los ojos, en el cuello y en las patas. Además, se detectaron úlceras en la mucosa oral, zonas de necrosis en las puntas de las orejas y partes del rabo, y el desprendimiento del estuche córneo de las pezuñas en algunas extremidades. Los pulmones presentaron una congestión generalizada y gran cantidad de pequeños focos necróticos repartidos por todo el parénquima (Imagen 25).

Durante la realización de la necropsia se tomaron las muestras necesarias para realizar un estudio histopatológico de los principales órganos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, linfonodos, piel y bazo). Las muestras tomadas para histología fueron procesadas siguiendo el protocolo habitual y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y con tinción específica de Gram (sólo piel y pulmón). Además, se realizó un cultivo microbiológico con material procedente de estos órganos tanto en agar sangre como en agar MacConkey. Por último, como el desarrollo de la epidermitis exudativa puede verse influido por la presencia de algunos virus como el PCV2 o el PPV, se valoró la presencia de anticuerpos específicos frente a estos virus mediante la utilización de dos kits ELISA comerciales (INGEZIM CIRCO IgG-IgM e INGEZIM PPV, INGENASA, España).

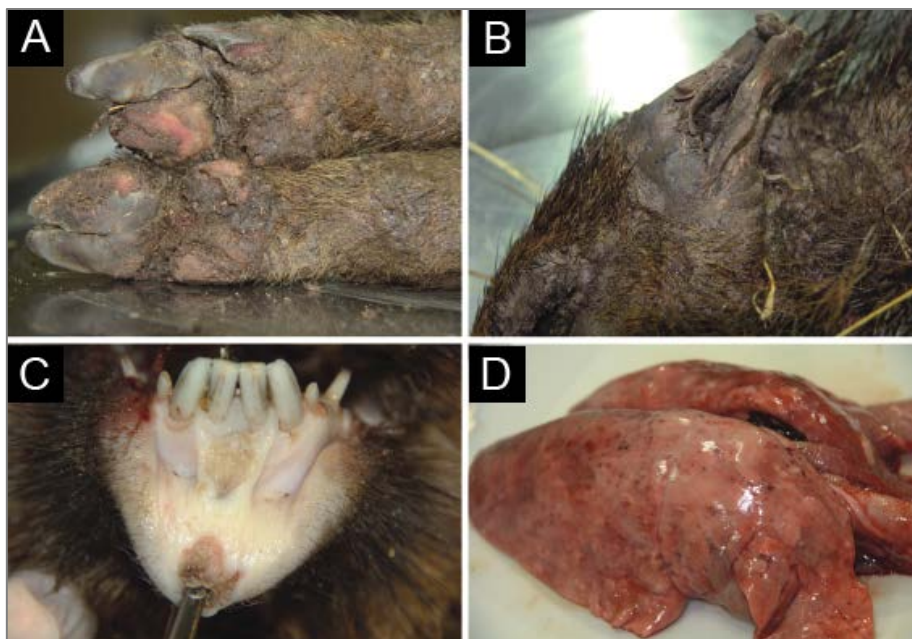


Imagen 25: Lesiones macroscópicas halladas en jabalí afectado por epidermitis exudativa. A) Ulceración y separación del estuche córneo de las zonas blandas de las pezuñas. B) Necrosis con pérdida de tejido en las puntas de las orejas. C) Ulceración de la mucosa oral. D) Pulmón congestivo con presencia de múltiples focos necróticos y hemorrágicos

El estudio histológico de las zonas de piel afectadas reveló la existencia de una dermatitis con presencia de acantosis, orto- y paraqueratosis, pústulas en la epidermis que predominantemente contenían neutrófilos degenerados y microcolonias de cocos gram-positivos (Imagen 26). Las zonas ulceradas de la piel estaban recubiertas por una capa de exudado necrótico. Además se observaron diferentes abscesos en las capas profundas de la dermis. Finalmente, el estudio histológico reveló la presencia de una grave neumonía embólica, con presencia de numerosos focos de necrosis en los que se incluían neutrófilos degenerados y microcolonias de cocos gram-positivos.

Staphylococcus hyicus fue aislado en las muestras procedentes de pulmón (cultivo puro) y piel (cultivo mixto en el que también se hallaron *Proteus* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*). Por último, no se detectaron anticuerpos frente a PCV2 ni frente a PPV en el animal afectado.

Esta supone la primera descripción de un caso de epidermitis exudativa en jabalí. El animal estudiado presentó lesiones muy parecidas a las descritas previamente

en cerdo doméstico, coincidiendo, en este caso, con una presentación subaguda de la enfermedad. El desarrollo subagudo de la enfermedad podría estar propiciado tanto por la edad del animal afectado (6 meses), como por la ausencia de factores que predisponen el desarrollo de formas más agudas, tales como coinfecciones con PCV2 y PPV, altas densidades poblacionales o deficiencias nutricionales.

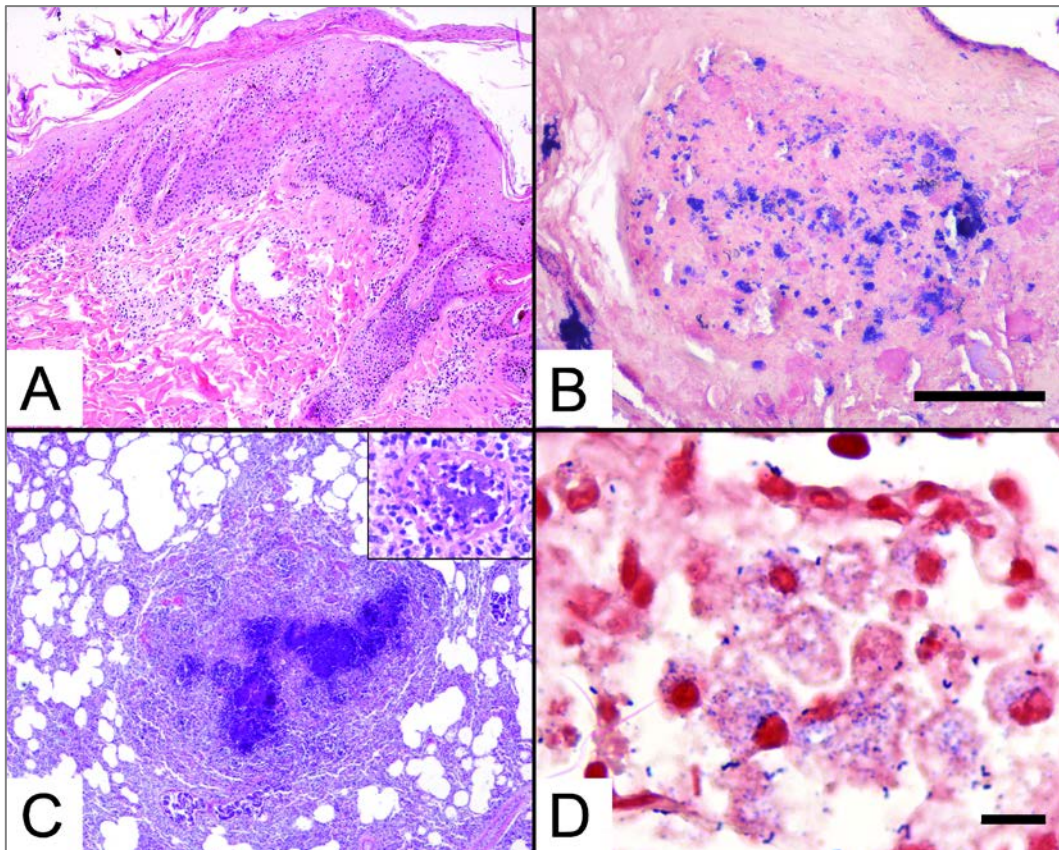


Imagen 26: Lesiones microscópicas halladas en jabalí afectado por epidermitis exudativa. A) Piel. Acanthosis irregular e hiperqueratosis. HE. 4X. B) Piel. Pústulas intraepidérmicas con numerosos cocos gram-positivos. Tinción de Gram. Barra 100 µm. C) Pulmón. Foco necrótico en pulmón. En la esquina superior derecha se puede observar un detalle con la presencia de bacterias en el interior de un vaso sanguíneo. HE. 10X. D) Pulmón. Numerosos cocos gram-positivos en el interior de macrófagos alveolares. Tinción de Gram. Barra 10 µm.

Pese a que durante este estudio no se demostró la virulencia de las cepas de *S. hyicus* aisladas en el animal afectado (no se valoró la capacidad de producir toxinas exfoliantes), el papel de este microorganismo en el desarrollo de las lesiones encontradas parece claro. En primer lugar, las lesiones histológicas encontradas fueron coincidentes con las descritas previamente en cerdo doméstico (Wegener y cols., 2006). Además, la presencia de gran cantidad de cocos gram-positivos compatibles con

S. hyicus en las lesiones cutáneas, sugiere la implicación de esta bacteria en el desarrollo de las mismas. Por último, en ausencia de métodos para valorar la virulencia de cepas de *S. hyicus*, todas ellas deben ser consideradas como cepas potencialmente capaces de producir epidermitis exudativa (Wegener y cols., 2006).

Generalmente, los animales que sufren formas clínicas subagudas de esta enfermedad sobreviven, aunque la recuperación es lenta y disminuyen sus índices productivos (Ginn y cols., 2007). Sin embargo, en este caso el cuadro de epidermitis se vio agravado por las lesiones neumónicas también producidas por *S. hyicus*, que pudieron dar lugar a la muerte del animal. Este microorganismo fue detectado en el pulmón tanto microbiológica como histológicamente, siendo asociado con las lesiones encontradas en este órgano. *Staphylococcus hyicus* había sido previamente aislado en tonsilas y fluidos bronquiales de cerdos aparentemente sanos (Hensel y cols., 1994). Sin embargo, nunca había sido asociado con este tipo de lesiones neumónicas hasta la fecha.

El patrón lesional encontrado en el pulmón, con gran cantidad de lesiones distribuidas por todo el parénquima, junto con la presencia de bacterias en el interior de los vasos sanguíneos, sugieren que la infección por *S. hyicus* en pulmón comenzó vía hematógena. Posiblemente, los abscesos situados en la dermis fueron la fuente primaria de la infección sistémica. La debilidad y la inmunosupresión producidas por un estado crónico de enfermedad pudieron favorecer la diseminación de *S. hyicus* por el organismo.

No se detectaron más casos de epidermitis exudativa en individuos pertenecientes a esta finca, por lo que parece que el efecto de esta enfermedad podría ser escaso en este tipo de poblaciones. La epidermitis exudativa afecta principalmente a granjas intensivas, con una elevada densidad de animales y que practican un destete precoz (Kim y cols., 2004). En los últimos años, el número de granjas intensivas dedicadas a la cría del jabalí se ha incrementado enormemente (Hälli y cols., 2012). En ellas concurren muchos de los factores predisponentes que favorecen el desarrollo de esta enfermedad, por lo que su impacto en estas explotaciones podría ser mayor.

A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate

David Risco Pérez, DVM; Pedro Fernández-Llario, PhD; Roser Velarde, PhD; Jesús M. Cuesta, DVM; Waldo L. García-Jiménez, DVM; Pilar Gonçalves, DBS; María Gil, DVM; Alfredo García, PhD; Joaquín Rey, PhD; Luis Gómez, PhD; Javier Hermoso de Mendoza, PhD

Summary

Exudative epidermitis, a porcine disease caused by *Staphylococcus hyicus*, produces serious economic losses in severely affected herds. In this report, we describe a case of exudative epidermitis in a wild boar presenting specific clinical signs. The affected animal was a female approximately 6 months old, with greasy brown exudates around the mouth and eyes and on the neck and legs, separation of the horn at the bulbs of the heels, necrosis of the tips of the pinnae and tail, and focal ulcerative stomatitis.

Multiple septic emboli and necrotic foci were observed in the lung. *Staphylococcus hyicus* isolates were obtained from affected skin and lungs. This disease and others that occur on wild boar farms, while similar to those described in domestic pigs, tend to produce specific clinical signs in wild boar, such as the pneumonic lesions in this case. Exudative epidermitis in this animal was aggravated by these pneumonic lesions. The increasing economic relevance of wild boar farming has led to an increase in the occurrence of infectious diseases. Knowledge

about their epidemiological, clinical, and pathological manifestations in wild boar will facilitate prevention, diagnosis, and treatment, reducing the impact on animal health and economics in this new niche swine production.

Keywords: swine, exudative epidermitis, wild boar, *Staphylococcus hyicus*, pneumonia

Received: November 17, 2012

Accepted: April 9, 2013

Resumen - Un caso de epidermitis exudativa en un jabalí joven de un granja Española

La epidermitis exudativa, una enfermedad porcina causada por el *Staphylococcus hyicus*, produce serias pérdidas económicas en hatos severamente afectados. En este reporte, describimos un caso de epidermitis exudativa en un jabalí que presentó signos clínicos específicos. El animal afectado era una hembra de aproximadamente 6 meses de edad, con exudado café grasosos alrededor de la boca, ojos, cuello, y piernas, también se observó separación del casco en el bulbo de los talones, necrosis de las puntas de la pinnae y cola, y estomatitis ulcerativa focal. Se observaron múltiples émbolos sépticos y pequeños focos necróticos en el pulmón. Se obtuvieron aislados de *S hyicus* de piel y pulmones afectados. Esta enfermedad y otras que ocurren en granjas de cerdos salvajes, aunque

son similares a aquellas descritas en cerdos domésticos, tienden a producir signos clínicos específicos en cerdos salvajes, tales como las lesiones neumónicas en este caso. La epidermitis exudativa en este animal se agravó por las lesiones neumónicas. El incremento en la relevancia económica de las granjas de jabalíes ha llevado a un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas. El conocimiento de sus manifestaciones epidemiológicas, clínicas, y patológicas en el jabalí facilitará la prevención, diagnóstico, y tratamiento, reduciendo el impacto en la salud animal y economía en este nuevo nicho de la producción porcina.

Résumé - Un cas d'épidermatite exsudative chez un jeune sanglier provenant d'un domaine de chasse espagnol

L'épidermatite exsudative, une maladie porcine causée par *Staphylococcus hyicus*,

entraîne de sérieuses pertes économiques dans les troupeaux sévèrement atteints. Dans le présent rapport nous décrivons un cas d'épidermatite exsudative chez un jeune sanglier présentant des signes cliniques spécifiques. L'animal affecté était une femelle d'environ 6 mois, avec un exsudat gras brunâtre autour de la bouche et des yeux, et sur le cou et les jambes, décollement de la corne au niveau du bulbe, nécrose de la pointe du pavillon de l'oreille et de la queue, et une stomatite ulcéraire focale. De multiples embolies septiques et des foyers nécrotiques ont été observés dans les poumons. Des isolats de *S hyicus* ont été obtenus de la peau atteinte et des poumons. Cette maladie et d'autres qui surviennent sur des fermes de sangliers, bien que similaires à celles décrites chez les porcs domestiques, a tendance à produire des signes cliniques spécifiques chez le sanglier, tels que des lésions de pneumonie dans le cas présent. L'épidermatite exsudative chez le présent animal était aggravée par ces lésions de pneumonie. La pertinence économique grandissante de l'élevage du sanglier a mené à une augmentation de la fréquence de maladies infectieuses. Les connaissances sur l'épidémiologie, les manifestations cliniques, et pathologiques chez les sangliers faciliteront la prévention, le diagnostic, et le traitement, réduisant ainsi l'impact sur la santé des animaux et l'économie dans cette nouvelle niche de production porcine.

DRP, PFL, JMC, WLGJ, PG, MG, AG, JR, LG, JHM: Red de grupos de investigación Recursos Faunísticos, University of Extremadura, Cáceres, Spain.

RV: Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain.

Corresponding author: Dr David Risco Pérez, Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria-UEX, Cáceres, Spain; Tel: +34927257114; Fax: +34927257110; E-mail: riscope@unex.es.

This article is available online at <http://www.aasv.org/shap.html>.

Risco Pérez D, Fernández-Llario P, Velarde R, et al. A case of exudative epidermitis in a young wild boar from a Spanish game estate. *J Swine Health Prod*. 2013;21(6):304–308.

Exudative epidermitis is a porcine disease that has been described in all major pig-producing countries.¹ In spite of its sporadic occurrence, this disease may produce important economic losses in affected herds.²

Exudative epidermitis is caused by virulent *Staphylococcus hyicus*.¹ However, the presence of *S. hyicus* in the skin may not be enough to produce clinical disease, and predisposing factors are presumably necessary for the disease to appear.³⁻⁵ Thus, co-infections with viral agents, such as porcine parvovirus (PPV) or porcine circovirus type 2 (PCV2),^{6,7} skin injuries, or nutritional deficiencies may predispose piglets to develop the clinical disease.⁸

This disease occurs mainly in intensive pig farms with large units, early weaning, and high animal densities, affecting piglets aged 5 to 35 days.⁹ Exudative epidermitis may be presented in peracute, acute, and subacute forms.¹⁰ Peracute and acute forms mainly affect non-immune suckling and newly weaned pigs, occurring as a general epidermitis which may lead to dehydration and death.¹ Clinical signs begin with reddening of the skin, followed by dark brown and greasy exudation in all parts of the body. In addition, ulcers may appear in the mouth, and separation of the horn may occur at the bulbs of the heels. Severely affected pigs may be anorexic and lose weight, dying rapidly.^{1,8}

More chronic forms are characterized by involvement of smaller areas of the body and affect both adults and immune piglets. The skin may be yellowish with little exudation, but may be ulcerated in defined areas. Additional lesions, such as subcutaneous abscesses, necrosis of the ears and tail, and polyarthritis, may also occur. This form of the disease delays growth in survivors.^{1,8}

The domestic pig and wild boar are susceptible to similar pathogens, including important agents such as *Erysipelothrix rhusiopathiae*¹¹ and *Mycobacterium* species.¹² Nevertheless, to the authors' knowledge, exudative epidermitis has not been described in wild boar to date. This report describes a case of exudative epidermitis in a wild boar from a game estate in Spain, including details of the pathological and microbiological investigation of the affected animal.

Case description

No animal care approval was required due to the nature of the case. The animal was not manipulated beyond what would be required for diagnostic purposes.

The studied animal came from a wild boar population located in Oropesa (northeast of Toledo Province, Castilla La Mancha, Central Spain). This area has a continental thermal Mediterranean climate, with hot dry summers (26°C to 28°C) and mild and moderately wet winters (7°C to 10°C). The vegetation consists mainly of scrubland (genus *Cistus* species, eg, *Cistus ladanifer*), arbutus (*Arbutus unedo*), and evergreen oak forests (*Quercus suber*).

The home range of this population (about 2000 Ha) is surrounded by a fence to prevent dispersion of the animals. Approximately 350 wild boar live within this estate, sharing the area with many red deer (density approximately 25 red deer per 100 Ha). The wild boar population is composed mostly of 1- to 2-year-old animals (70%). Wild boar are not artificially fed except in the summer months (June to September), when they are supplemented with a specially designed fodder for wild boar (Jabali Familia; Mercoguardiana, SA, Navavillar de Pela, Badajoz, Spain). Seven feeders are surrounded by a selective fence, allowing entrance of wild boar exclusively. Population data are obtained through analysis of photographs taken by four cameras (HCO Scoutguard SG550-V Camo; HCO Outdoor Product, Norcross, Georgia) located near feeders. The cameras are checked weekly during the summer season. The studied animal was found dead next to a feeder in July 2011 and was immediately submitted to the Veterinary Faculty of Caceres (Spain).

Gross clinical lesions

The animal was received within 10 hours after its death. The time of death was accurately estimated, as workers who had fed the animals 10 hours earlier had not found a dead pig near the feeders. The affected animal was a 6-month-old female (age estimate based on tooth replacement and eruption patterns).¹³ External examination revealed poor body condition, with greasy brown exudates and skin ulcers around the mouth and eyes and on the neck and legs, and separation of the horn at the bulbs of the heels. Necrosis with loss of tissue affecting the tips of the pinnae and tail were also present. Cervical and inguinal lymph nodes were moderately swollen. Lungs were diffusely hyperemic, with multifocal white 1- to 3-mm foci surrounded by hemorrhagic halos throughout the parenchyma (Figure 1).

Pathological and microbiological examinations

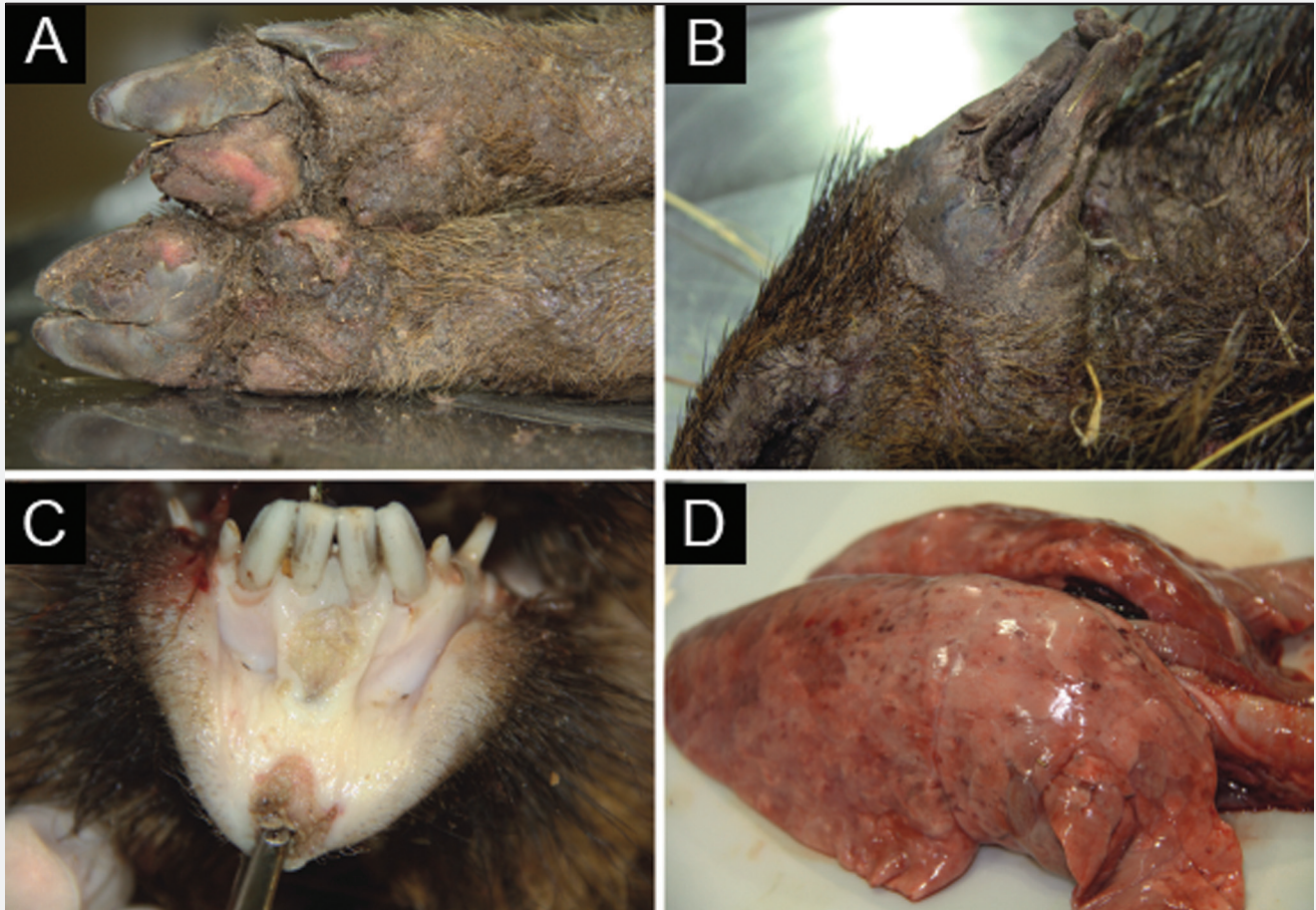
Tissue samples from brain, heart, kidney, liver, lungs, lymph nodes, skin, and spleen were collected and processed for histopathological examination. Briefly, tissues were placed in 10% buffered formalin, trimmed, and embedded in paraffin, sectioned at 3 to 4 µm, and stained with hematoxylin and eosin. Skin and lung sections were also stained with Gram stain. In addition, in order to conduct a microbiological study, tissue samples from heart, kidney, liver, lung, skin, and spleen were cultured on blood agar and MacConkey agar plates and incubated aerobically for 24 hours at 37°C. Isolates obtained were identified using standard methods for phenotypic characterization as previously described.¹⁴ Identification was confirmed using the Phoenix 100 system for bacterial identification (Becton Dickinson, New Jersey).

Finally, as development of exudative epidermitis has been associated with viral co-infections, eg, PPV or PCV2,^{6,7} serum was tested for antibodies against these viruses. A blood sample obtained directly from the heart of the affected wild boar was centrifuged at 1500g for 5 minutes, and the harvested serum was stored at -20°C until used. Serum was tested by a commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA), Ingezim Circovirus IgG/IgM and Ingezim PPV (Ingenasa, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions.

Histopathological results

Histopathology revealed vesiculopustular dermatitis in the damaged skin, characterized by diffuse moderate irregular acanthosis (epidermal hyperplasia) and ortho- and parakeratotic hyperkeratosis with multifocal intraepidermal pustules that contained degenerate neutrophils, necrotic debris, and microcolonies of gram-positive cocci. In the dermis, there was mild superficial perivascular to interstitial edema and mild inflammatory infiltrate, mainly with mononuclear cells and fewer neutrophils. Ulcerated areas were covered with dried necrotic crusts; the suppurative exudate and bacteria extended to follicles and to deep layers of the dermis (abscess). The histopathological study confirmed severe embolic pneumonia with numerous foci of necrosis, including degenerated neutrophils and microcolonies of gram-positive cocci. In the surrounding parenchyma, alveoli were filled with neutrophils, macrophages, and cellular debris. Numerous gram-positive cocci were detected

Figure 1: Gross lesions in a wild boar (6 months of age) with exudative epidermitis. This animal was found dead in a game estate in Spain housing approximately 350 wild boar. A: Ulceration and separation of the hoof horn at the bulbs of the heels. B: Necrosis with loss of tissue at the tip of the pinna. C: Focal ulcerative stomatitis. D: Lung with generalized hyperemia and multifocal necrotic and hemorrhagic foci.



within the cytoplasm of macrophages (Figure 2). Minimal signs of autolysis were observed in these samples.

Microbiological and serological results

Pure growth of medium-sized, porcelain-white nonhemolytic colonies was obtained from lungs on blood agar plates. Similar colonies were predominant on blood agar cultures from skin. White nonhemolytic colonies were identified as *S hyicus* subspecies *hyicus* in both lung and skin cultures. The remainder of the isolates obtained from skin were identified as *Proteus* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiological cultures from other tissues remained sterile. Antibodies against PCV2 and PPV were not detected by ELISA testing.

Discussion

In this study, we have confirmed and described a case of exudative epidermitis in a wild boar. To the authors' knowledge, this is the first report of exudative epidermitis in a wild boar. Both macroscopic and microscopic lesions found in the studied animal were very similar to those previously described in domestic pigs. Lesions in this case were consistent with the subacute form of exudative epidermitis, characterized by skin lesions in delimited areas (eg, around eyes, snout, mouth, and heels).

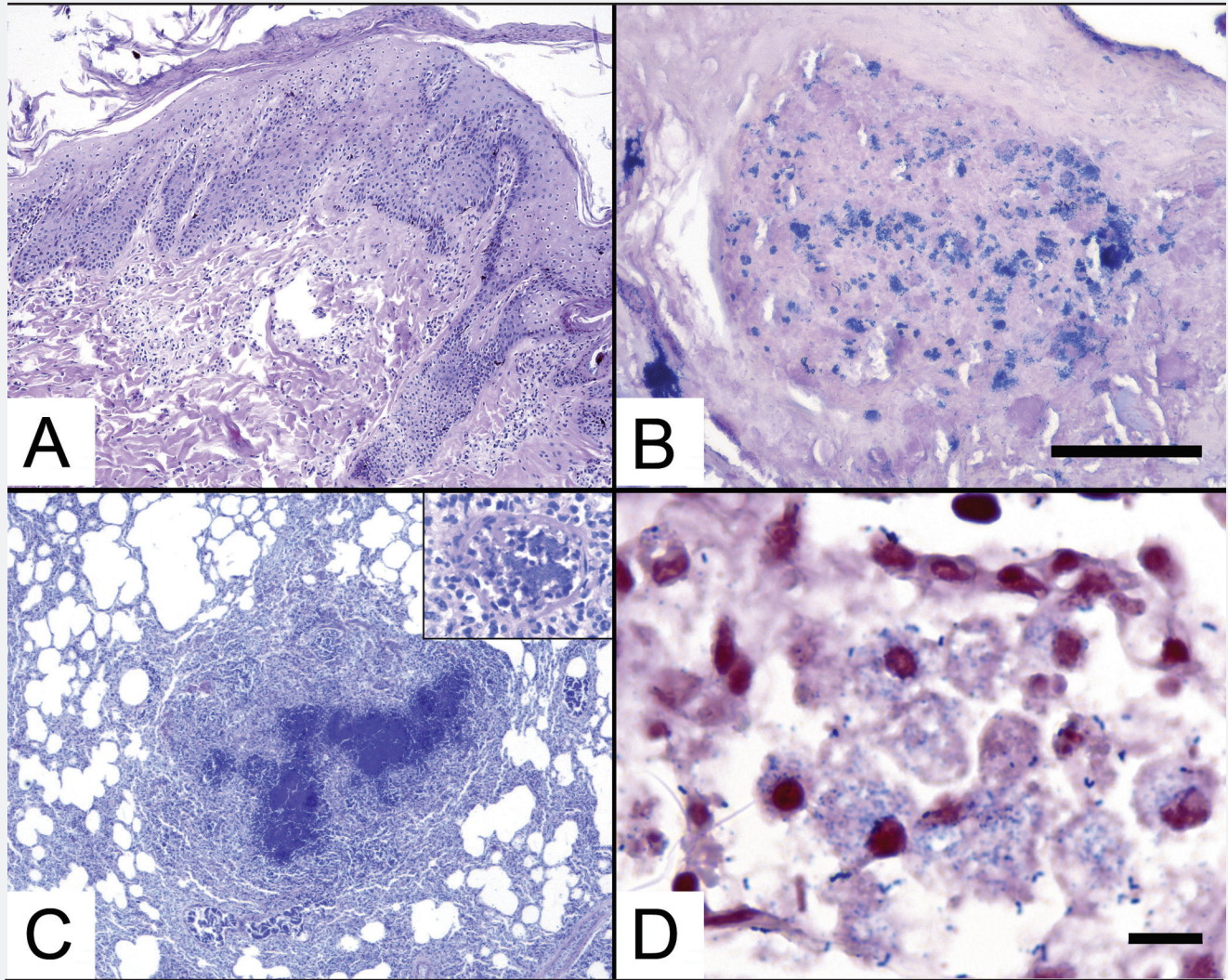
Other infectious diseases, such as swine vesicular disease (SWD), may produce skin lesions similar to those found in the studied animal.¹⁵ However, SWD rarely produces skin lesions in areas such as tips of the pinnae or tail.¹⁵ In addition, the causal agent of SWD has not been detected in Spain since

1993, and hence its presence in wild boar is very unlikely.

In general, subacute forms of exudative epidermitis are seen in animals older than 35 days and in immune young animals. In this case, the animal was a 6-month-old wild boar. In addition, factors that usually predispose to more acute forms of exudative epidermitis, such as co-infection with PCV2 or PPV, were not detected by ELISA testing for antibodies to these viruses. Other factors that may also predispose swine to more severe forms of exudative epidermitis, such as high animal density or nutritional deficiencies, were not involved, since the animals were fed daily. Therefore, to our knowledge, no predisposing factors existed in this case.

Staphylococcus hyicus was isolated from the damaged skin along with *P aeruginosa* and *Proteus* species. Secondary infection with

Figure 2: Microscopic lesions in a wild boar with exudative epidermitis (described in Figure 1). A: Skin showing moderate irregular acanthosis (epidermal hyperplasia) and hyperkeratosis (hematoxylin and eosin [H&E] stain, original magnification 40×). B: Skin showing intraepidermal pustule with numerous gram-positive cocci (Gram stain; bar = 100 µm). C: Lung showing foci of necrosis resulting from septic emboli. Inset, bacteria within a vessel (H&E stain, original magnification 40×). D: Lung showing numerous gram-positive cocci within alveolar macrophages (Gram stain; bar = 10 µm).



these microorganisms is common in cases of exudative epidermitis.¹ The ability to produce exfoliative toxin would have had to be tested to assess the virulence of the *S hyicus* isolates obtained and to confirm the diagnosis.¹⁶ However, in the absence of methods to differentiate virulent from avirulent strains, all types of *S hyicus* should be regarded as potentially virulent.¹ Furthermore, the appearance of gram-positive colonies coincident with *S hyicus* in the typical histological lesions of exudative epidermitis clearly suggests the implication of *S hyicus* in development of the skin lesions.

Piglets with the subacute forms of exudative epidermitis frequently survive, although recovery is slow and there is usually a marked depression in growth rate.⁸ However, in this

case, exudative epidermitis was aggravated by the pneumonic lesions attributed to *S hyicus*. The presence of *S hyicus* in the lung was detected not only by culture but also histologically in the alveolar exudate, where large numbers of gram-positive cocci were observed in the cytoplasm of macrophages and in septic emboli. *Staphylococcus hyicus* has also been isolated from tonsils and bronchial lavage fluids of healthy pigs¹⁷ and from the pneumonic lung of a dead pig;¹⁸ however, to the authors' knowledge, pneumonic lesions produced by this microorganism have not previously been described in an animal with exudative epidermitis.

The multiple, widely distributed lesions in the lungs, along with observation of septic emboli

within vessels, suggests a hematogenous rather than an aerogenous route of infection. The abscesses in the deep dermis were most likely the source of those septic emboli. The debility produced by this chronic disease and associated immunosuppression might favor occurrence of septic emboli and hence the spread of *S hyicus* to the lungs.

No additional cases of exudative epidermitis were detected in the studied estate. However, we cannot be sure that no other cases had occurred. The extensive size of this game estate makes it very difficult to accurately assess mortality, since dead animals could be removed quickly by predators, remaining undetected.

Exudative epidermitis affects mainly intensive swine farms with large numbers of animals, early weaning, and high animal densities.⁹ In recent years, the number of intensive wild boar farms has increased notably in order to supply more animals for hunting or consumption.^{19,20} In addition, in these farms, factors predisposing to exudative epidermitis have been found, such as a high prevalence of PCV2 and PPV.¹⁹ Thus the risk of exudative epidermitis in wild boar may be higher than expected in these farms, which might produce serious economic losses.

This disease and others that occur on wild-boar farms, while similar to those described in domestic pigs, tend to produce specific clinical signs in wild boar, for example, ocular damage in wild boar with swine erysipelas¹¹ or pneumonic lesions caused by *S hyicus* as described in this case. Thus, increasing knowledge about the epidemiological, clinical, and pathological characteristics of these diseases in wild boar will facilitate prevention, diagnosis, and treatment, reducing the health and economic impact on this new swine-production niche.

Implications

- Exudative epidermitis may occur in wild boar, with lesions similar to those found in domestic pigs.
- Wild boar affected by exudative epidermitis may have severe pneumonic lesions caused by *S hyicus*, suggesting a hematogenous route of infection.

Acknowledgments

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España) and Gobierno de Extremadura. Dr Risco has a Formación de Profesorado Universitario grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

Conflict of interest

None reported.

References

1. Wegener HC, Skov-Jensen EW. Exudative epidermitis. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006:675–679.
2. Pepper TA, Taylor DJ. The effect of exudative epidermitis on weaner production in a small pig herd. *Vet Rec*. 1977;101:204–205.
3. Aarestrup FM, Wegener HC. Association between production of fibrinolysin and virulence of *Staphylococcus hyicus* in relation to exudative epidermitis in pigs. *Acta Vet Scand Suppl*. 1997;38:295–297.
4. Andresen LO, Wegener HC, Bille-Hansen V. *Staphylococcus hyicus*-skin reactions in piglets caused by crude extracellular products and by partially purified exfoliative toxin. *Microb Pathog*. 1993;15:217–225.
5. Tanabe T, Sato H, Watanabe K, Hirano M, Hirose K, Kurokawa S, Nakano K, Saito H, Maehara N. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. *Vet Microbiol*. 1996;48:9–17.
6. Wattrang E, McNeilly F, Allan GM, Greko C, Fossum C, Wallgren P. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Vet Microbiol*. 2002;86:281–293.
7. Whitaker HK, Neu SM, Pace LW. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. *J Vet Diagn Invest*. 1990;2:244–246.
8. Ginn PE, Mansell JEKL, Rakich PM. Skin and appendages. In: Maxie MG, Jubb KVF, eds. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Edinburgh, United Kingdom: Elsevier; 2007:679–680.
9. Kim J, Chae C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *Vet J*. 2004;167:104–106.
10. Wegener HC, Andresen LO, Bille-Hansen V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. *Can J Vet Res*. 1993;57:119–125.
11. Risco D, Llario PF, Velarde R, García WL, Benítez JM, García A, Bermejo F, Cortés M, Rey J, De Mendoza JH, Gómez L. Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain. *Trans Emerg Dis*. 2011;58:445–450.
12. García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, Abecia JA, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Ortiz-Peláez A, Salguero FJ, Smith NH, Gómez L, Hermoso de Mendoza J. Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Trans Emerg Dis*. 2012;60:102–109.
13. Boitani L, Mattei L. Aging wild boar (*Sus scrofa*) by tooth eruption. In: Spitz F, Janeau G, González G, Aulagnier S, eds. *Ongules/Ungulates*. 9th ed. Toulouse, France: SFEPM-IRGM; 1992:419–421.
14. Barrow GI, Feltham RKA. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1993:52–57.
15. Lubroth J, Rodríguez L, Dekker A. Vesicular diseases. In: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006:517–536.
16. Andresen LO, Ahrens P. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. *J Appl Microbiol*. 2004;96:1265–1270.
17. Hensel A, Ganter M, Kipper S, Krehon S, Wittenbrink MM, Petzoldt K. Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *Am J Vet Res*. 1994;55:1697–1702.
18. Skalka B. *Výskyt stafylokokových druhů u klinicky zdravých hospodářských zvířat* [Occurrence of staphylococcal species in clinically healthy domestic animals]. *Veterinarní Medicina* [Veterinary Medicine – Praha]. 1991;36:9–19.
19. Halli O, Ala-Kurikka E, Nokireki T, Skrzypczak T, Raunio-Saarnisto M, Peltoniemi OAT, Heinonen M. Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *Vet J*. 2012;194:98–101.
20. Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J. Disease risks and overabundance of game species. *Eur J Wildl Res*. 2006;52:81–87.



5.5 Lesiones oculares asociadas a *Chlamydia suis* en una cría de jabalí en una población semi-intensiva de España. (*Ocular lesions associated with Chlamydia suis in a wild boar piglet (Sus scrofa) from a semi free range population in Spain*).

Los animales salvajes pueden ser portadores de diversos parásitos o patógenos infecciosos entre los que se encuentran los microorganismos pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* (Salinas y cols., 2009; Wacheck y cols., 2010). Las infecciones con este tipo de patógenos dan lugar a diferentes manifestaciones clínicas (problemas reproductivos, conjuntivitis, neumonía, etc.), descritas tanto en animales domésticos como en humanos (Longbottom y cols., 2003).

En este sentido, el jabalí puede suponer un importante reservorio para estos microorganismos ya que puede albergar algunas de las especies más importantes de la familia *Chlamydiaceae*: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus* o *Chlamydia suis* (Hotzel y cols., 2004). Además, las altas seroprevalencias encontradas en los jabalíes de nuestro país sugieren que este tipo de infecciones podrían estar bastante extendidas entre estos animales (Salinas y cols., 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene información de cómo este tipo de infecciones repercuten en la salud de las poblaciones de jabalí. En este trabajo se describe un caso clínico en el que una cría de jabalí mostró una grave queratoconjuntivitis provocada por *C. suis*.

El animal afectado fue encontrado en una finca situada al este de la provincia de Badajoz (España). Esta finca, totalmente vallada, ocupa una superficie de 500 hectáreas en las que vivían aproximadamente 500 jabalíes, alimentados diariamente mediante el suministro de cereales o piensos específicos.

El animal afectado, de unas 10 semanas de edad, fue encontrado por los operarios de la finca apartado del grupo familiar y mostrando síntomas de desorientación. Además, el animal presentaba abundantes descargas nasales, blefaritis y una marcada opacidad corneal. No respondía a ningún estímulo visual y murió al poco tiempo de ser capturado.

Durante la necropsia se observó que el animal presentaba grandes úlceras corneales en ambos ojos, lesiones neumónicas en los lóbulos apicales y hemorragias epidurales. El estudio histopatológico confirmó la pérdida de las capas más superficiales de la córnea en las zonas ulceradas y reveló la presencia de células inflamatorias en las diferentes capas de la córnea, membrana coroidea y la retina. Además, se observó una marcada degeneración en el nervio óptico y en las fibras nerviosas de la retina. Finalmente, se confirmó la presencia de una bronconeumonía intersticial con hiperplasia del BALT (Imagen 27).

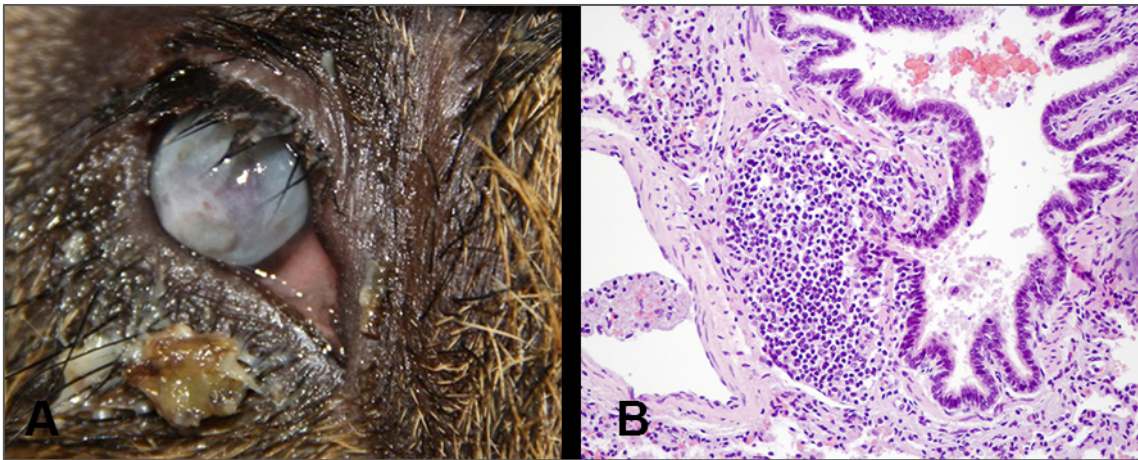


Imagen 27: Lesiones mostradas por el jabalí infectado por *Chlamydia suis*. A) Blefaritis con presencia de exudados oculares y marcada opacidad corneal. B) Pulmón. Bronconeumonía con presencia de exudados bronquiales e hiperplasia del BALT. HE. 20X.

Por otra parte, se realizó un completo estudio microbiológico que incluyó el cultivo microbiológico en medios de cultivo rutinarios (agar sangre y agar MacConkey) de material procedentes de los principales órganos (ojos, pulmones, corazón, riñón y bazo). Todos los cultivos resultaron estériles excepto el realizado con material procedente de pulmón, en el cual se halló la presencia de streptococos α -hemolíticos. Paralelamente, se valoró la presencia de microorganismos pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* en estos mismos órganos, mediante la realización de un ensayo PCR específico (Teankum y cols., 2006). Con esta prueba se detectó la presencia de ADN perteneciente a la familia *Chlamydiaceae* en ambos ojos. La posterior secuenciación de este ADN confirmó que correspondía a bacterias de la especie *Chlamydia suis*.

Por lo tanto, en este caso clínico se describe la presencia de una queratoconjuntivitis grave asociada a una infección ocular por *C. suis* en jabalí. Este tipo de lesiones ya habían sido asociadas a infecciones con agentes de la familia *Chlamydiaceae* en diferentes especies animales. Sin embargo, esta supone la primera descripción en jabalí (Polkinghorne y cols., 2009).

En cerdo doméstico se habían realizado estudios experimentales en los que se demostró que infecciones oculares por *C. suis* pueden dar lugar a conjuntivitis subclínicas. Esto sugiere que, en este caso, el cuadro clínico se puede haber visto agravado por la existencia de otros factores (Rogers y cols., 1999). En este sentido, los elevados niveles de polvo que se generan en los comederos comunales al suministrar la comida podría suponer un factor predisponente para el desarrollo de este tipo de lesiones (Becker y cols., 2007).

La presencia de este tipo de queratoconjuntivitis puede tener una gran importancia en animales salvajes como el jabalí. La falta de respuesta a estímulos visuales puede mermar las capacidades adaptativas de estos animales al medio, dificultando su defensa frente a depredadores o su capacidad para seguir al grupo familiar. Por estos motivos, este tipo de infecciones podrían dar lugar a un aumento en la mortalidad en las poblaciones de jabalíes.

Por otra parte, los microorganismos pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* han sido asociados a otros cuadros clínicos como diarrea, neumonía o fallo reproductivo en cerdos domésticos. Este tipo de cuadros no han sido aún encontrados en el jabalí; sin embargo, su presencia no puede ser descartada. Así, serán necesarias más investigaciones encaminadas a valorar las repercusiones clínicas que las infecciones por *Chlamydiaceae* pueden producir en el jabalí.

OCULAR LESIONS ASSOCIATED WITH *CHLAMYDIA SUIS* IN A WILD BOAR PIGLET (*SUS SCROFA*) FROM A SEMI-FREE RANGE POPULATION IN SPAIN

David Risco, D.V.M., Alfredo García, Ph.D., Pedro Fernández-Llario, Ph.D., Waldo L. García, D.V.M., José M. Benítez, D.V.M., Pilar Gonçalves, D.V.M., Jesús M. Cuesta, D.V.M., Luis Gómez, Ph.D., Joaquín Rey, Ph.D., and Javier Hermoso de Mendoza, Ph.D.

Abstract: The role of the wild boar (*Sus scrofa*) as a reservoir for a large number of pathogens that can affect both domestic animals and humans has been widely studied in the last few years. However, the impact of some of these pathogens on the health of wild boar populations is still being determined. This article presents a clinical case of severe bilateral keratoconjunctivitis affecting a 2-mo-old piglet from a semi-free range population in Spain. Histopathologic and microbiologic analysis revealed lesions in the cornea, choroid, and optical nerve, and *Chlamydia suis* was detected in the eyes bilaterally. The visual handicap resulting from this type of lesion greatly affects the survival of this affected piglet.

Key words: *Chlamydia suis*, eye, keratoconjunctivitis, *Sus scrofa*, wild boar.

BRIEF COMMUNICATION

Wild animals can be carriers of a large number of infectious and parasitic pathogens,¹² including those belonging to the Chlamydiaceae family.⁹ The pathogenicity of these microorganisms has been demonstrated in both humans and domestic animals,⁴ in which they cause conjunctivitis,⁸ pneumonia, and reproductive disorders.^{3,4,8} Wild animals could play an important role in the epidemiology of Chlamydiaceae.⁹ Among these wild species, the wild boar (*Sus scrofa*) could be especially important, as this swine can host some of the most important chlamydial species affecting both human and animal health: *Chlamydiophila psittaci*, *Chlamydiophila abortus*, and *Chlamydia suis*.² In addition, high seroprevalence to Chlamydiaceae and particularly *C. abortus* has been demonstrated in Spain, indicating frequent contacts of the wild boar with bacteria from this family.⁹ However, to date, it has not been possible to relate these bacteria to any disease affecting wild boar.⁹ In this case affecting a wild boar, the presence of *C. suis*-associated keratoconjunctivitis, which could compromise the piglet's survival, is described.

The affected wild boar came from a farm located in the central eastern Badajoz Province (Spain). The farm occupies an area of almost 500 ha and has a single perimeter fence. It holds a large wild boar population, reaching 100 individ-

uals/km². The average age of the animals is about 3 yr, and sex distribution is biased toward females as a result of the selective hunting of males. For most of the year, the animals are given supplemental food. Adults are fed a mix of corn and barley in four feeding troughs. Individuals under the age of 6 mo are fed with fodder provided to domestic piglets in another four feeding troughs designed with barriers to avoid access of adults. Population counts were made in these feeding areas, as they are used by most of the wild boars. Nevertheless, the presence of wild boars in other parts of the farm has been documented by infrared cameras.

A 10-wk-old male wild boar piglet was found by farmhands separated from the family group displaying clear symptoms of disorientation. The animal had abundant nasal mucus, intense corneal opacity, and blepharitis. The piglet lacked a menace reflex and did not respond to any visual stimulus. The farmhand tried to feed it artificially, but a few hours later it died and was immediately refrigerated and taken to the Veterinary Faculty of the University of Extremadura.

Large areas of ulcerations, along with corneal opacity, were observed in both eyes during necropsy (Fig. 1). The lungs revealed well-demarcated purple-to-gray pneumonic lesions in the apical lobes. Epidural hemorrhages were also noted around the brain and cerebellum.

Samples were preserved in 4% formaldehyde and embedded in paraffin for histopathology. Microtome cuts (4- μ m thick) were stained with hematoxylin and eosin. A loss of the corneal surface layer cells was documented. Lympho-

From the Departamento Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Avda. de la Universidad s/n, 10.003 Cáceres, Spain. Correspondence should be directed to Dr. Risco (riscope@unex.es).

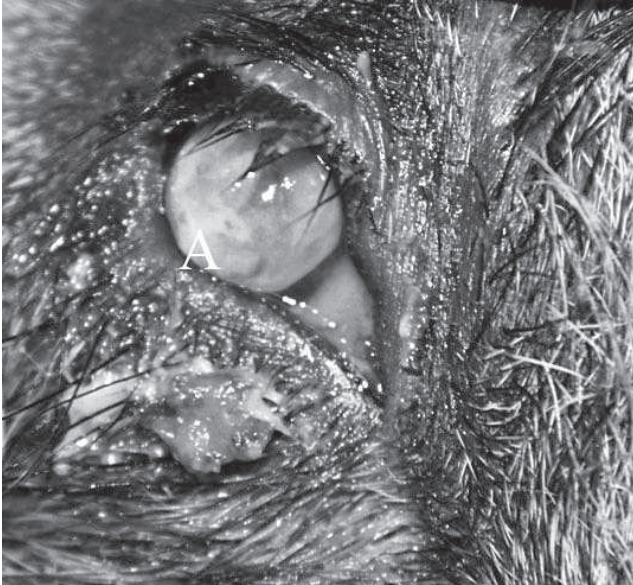


Figure 1. Right eye: Corneal opacity with ulceration (A) and blepharitis.

cytes, plasma cells, and some macrophages and neutrophils were present among the different layers of the cornea, choroid membrane, and retina. A degeneration of the nerve fiber layers was also present in the retina (Fig. 2); these alterations were similar to those observed in the optical nerve. There were signs of demyelination

accompanied by a proliferation of glial cells. In the lungs, interstitial pneumonia was observed with bronchitis and bronchiolitis along with a significant increase of lymphoid tissue associated with the bronchial tubes. Alveolar collapse was noted in other areas.

Culture samples were obtained using sterile swabs that were plated on blood agar and MacConkey agar under aerobic conditions. The eyes, brain, lungs, heart, liver, kidneys, and spleen were cultured. All samples were negative except the lungs, in which the presence of α -hemolytic *Streptococcus* was detected.

For DNA extraction, tissues from the eyes, brain, lungs, heart, liver, kidneys, and spleen were used. DNA was extracted utilizing the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, RH10 9NQ, United Kingdom). A polymerase chain reaction (PCR) assay was performed using the primers cIGS-1f and cIGS-2r, which were designed to target the 370-base pair (bp) variable region of the genomic Chlamydiaceae DNA, including 80 bp of the 16S rRNA gene, 240 bp of the rRNA intergenic spacer region, and 50 bp of the 23S rRNA gene.¹¹ PCR products were separated by 1% agar gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining under ultraviolet light. Only DNA extracted from both eyes were positive for the PCR test.

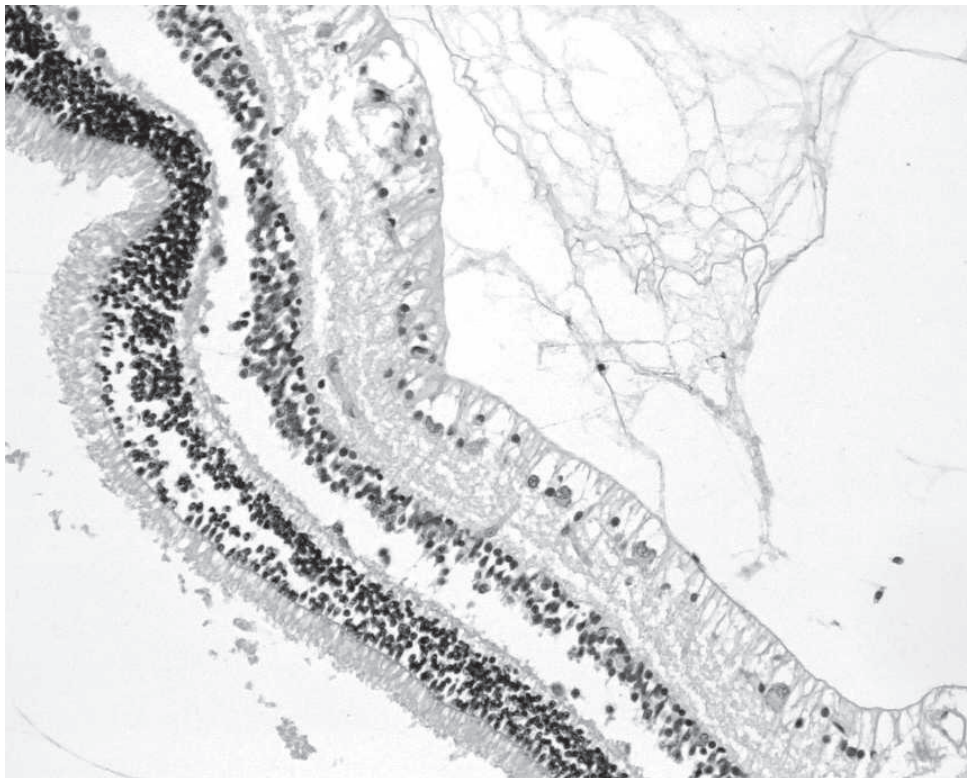


Figure 2. Retina: Degeneration and destruction of its components. Hematoxylin and eosin, $\times 200$.

Size-matching bands were cut out of the gel and DNA was extracted using the Ultra Clean™ GelSpin DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, California, 92010, USA). The 370-bp amplified product was sequenced in both directions and was compared with GenBank sequences using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). The closest matches for this sequence (with 98% identity) were *C. suis* R19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence (DDJB accession No. AF481047).

This study demonstrated the presence of *C. suis* infection in the eyes of a wild boar. The eyes are commonly affected by Chlamydiaceae.⁵ All members of Chlamydiaceae have been associated with symptoms of keratoconjunctivitis in their respective host species.⁵ However, the presence of this chlamydial species has not been documented to be associated with ocular pathology in the wild Iberian boar.

This clinical case reveals that the pathogenic action of chlamydia in the eye of the wild boar is similar to that described experimentally in pigs.⁷ Experimentally, conjunctivitis associated with *C. suis* produced subclinical conjunctivitis 7–14 days postinfection. This indicates that the appearance of these ocular symptoms could be related to other factors,⁷ such as the use of intensive management.¹ In this case, the use of communal feeding troughs for wild boar, which raise a large amount of dust, could have predisposed this herd to ocular and respiratory pathologies.⁷

Ocular lesions caused by *C. suis* in domestic animals are not very important, whereas in semi-free range living wild boar this type of lesion could have very severe consequences. The keratoconjunctivitis symptoms found in this wild boar could have led to the animal's visual impairment, limiting its chances of survival. This impairment compromises the animal's defense against predators; its capacity to follow the family group; and the maintenance of the hierarchical position that leads to subsequent access to food. For these reasons, the presence of such infections in a wild boar population could increase the rate of mortality in affected animals.

In experimental infections with *C. suis* conducted on domestic pigs, pulmonary lesions characterized by bronchiolitis with inflammatory cells in the alveolar lumen, interstitial inflammatory infiltration, and edema have been reported.⁶ In this case, the lung lesions are similar; however, the

Chlamydiaceae could not be isolated from the lungs. The presence of α -hemolytic *Streptococcus* in the lung has not been associated with the lesions observed in this case.

The pulmonary symptoms observed could be associated with other agents not detectable by the laboratory techniques used, such as *Mycoplasma hyopneumoniae* or porcine respiratory and reproductive syndrome virus. However, the presence of these pathogens has never been related to ocular lesions such as those described in this case.

Chlamydia suis has been described¹⁰ as an agent causing respiratory, diarrheic, and reproductive symptoms in pigs. To date, none of these signs has been associated with the presence of *C. suis* in wild boar. However, it cannot be ruled out. Hence, further studies are needed to determine the pathogenicity of *C. suis* in the wild Iberian boar.

Acknowledgment: Dr. Risco is the recipient of a Formacion Profesorado Universitario grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2009-0704).

LITERATURE CITED

1. Becker, A., L. Lutz-Wohlgroth, E. Brugnera, Z. H. Lu, D. R. Zimmermann, F. Grimm, E. Grosse Beilage, S. Kaps, B. Spiess, A. Pospischil, and L. Vaughan. 2007. Intensively kept pigs pre-disposed to chlamydial associated conjunctivitis. *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 54: 307–313.
2. Hotzel, H., A. Berndt, F. Melzer, and K. Sachse. 2004. Occurrence of *Chlamydiaceae* spp. in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). *Vet. Microbiol.* 103: 121–126.
3. Longbottom, D. 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet. J.* 168: 9–11.
4. Longbottom, D., and L. J. Coulter. 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128: 217–244.
5. Polkinghorne, A., N. Borel, A. Becker, Z. H. Lu, D. R. Zimmermann, E. Brugnera, A. Pospischil, and L. Vaughan. 2009. Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Vet. Microbiol.* 135: 142–146.
6. Reinhold, P., N. Kirschvink, D. Theegarten, and A. Berndt. 2008. An experimentally induced *Chlamydia suis* infection in pigs results in severe lung function disorders and pulmonary inflammation. *Vet. Res.* 39:3S.
7. Rogers, D. G., and A. A. Andersen. 1999. Conjunctivitis caused by a swine *Chlamydia trachoma*

tis-like organism in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Investig.* 11: 341–344.

8. Rohde, G., E. Straube, A. Essig, P. Reinhold, and K. Sachse. 2010. Chlamydial zoonoses. *Chlamydiale Zoonosen* 107: 174–180.

9. Salinas, J., M. R. Caro, J. Vicente, F. Cuello, A. R. Reyes-Garcia, A. J. Buendía, A. Rodolakis, and C. Gortázar. 2009. High prevalence of antibodies against Chlamydiaceae and *Chlamydophila abortus* in wild ungulates using two “in house” blocking-ELISA tests. *Vet. Microbiol.* 135: 46–53.

10. Taylor, D. J. 2006. Miscellaneous bacterial infections. *In*: Straw, B., J. Zimmermann, S. D’Allaire,

and D. J. Taylor (eds.). *Diseases of Swine*, 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. Pp. 817–843.

11. Teankum, K., A. Pospischil, F. Janett, E. Bürgi, E. Brugnera, K. Hoelzle, A. Polkinghorne, R. Weilenmann, D. R. Zimmermann, and N. Borel. 2006. Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts. *Vet. Microbiol.* 116: 149–157.

12. Wacheck, S., M. Fredriksson-Ahomaa, M. König, A. Stolle, and R. Stephan. 2010. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens Dis.* 7: 307–312.

Received for publication 2 February 2011

5.6 Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* del tracto respiratorio del jabalí: implicaciones patológicas. (*Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the respiratory tract of wild boar: pathologic implications*).

Aeromonas hydrophila (*A. hydrophila*) es un bacilo gram-negativo que ha sido ampliamente descrito como patógeno en peces, anfibios y reptiles (Gray, 1984). Además, este agente ha sido asociado con algunos cuadros clínicos como diarrea, neumonía o abortos en humanos y otros mamíferos (Janda y cols., 2010).

Pese a que este patógeno se ha aislado en gran cantidad de especies animales, aún no se ha descrito su presencia en el jabalí. En este artículo se describe el aislamiento de *A. hydrophila* en una cría de jabalí que presenta lesiones neumónicas graves.

En los últimos años, en diferentes poblaciones de jabalí se han encontrado brotes de enfermedades producidas por patógenos que no habían sido hallados anteriormente en esta especie (Risco y cols., 2011; Risco y cols., 2013b). Muchos de estos brotes tienen importantes consecuencias clínicas y producen elevadas mortalidades. Por este motivo, se realizó un muestreo encaminado a verificar la presencia de *A. hydrophila* en el tracto respiratorio de los jabalíes y su posible papel como patógeno respiratorio en este animal.

El estudio se realizó en una finca situada en la provincia de Ciudad Real (España). Esta finca se divide en dos partes bien diferenciadas. La primera, de unas 3000 hectáreas, daba cobijo a un total de 350 jabalíes. Por su parte, la segunda se concibe como una granja de cría en la que vivían un total de 28 jabalíes adultos que eran alimentados artificialmente.

El animal que originó este estudio fue un joven jabalí de unos 5 meses de edad que fue encontrado moribundo por uno de los operarios de la finca. El animal mostraba depresión, disnea y abundantes descargas nasales antes de su muerte. Durante la necropsia se detectaron lesiones neumónicas con presencia de exudados

purulentos, que afectaban a la mayor parte del parénquima pulmonar (Imagen 28). En el cultivo microbiológico que se realizó de material procedente del pulmón, se obtuvo un aislamiento puro que fue identificado como *A. hydrophila* mediante la realización de una galería API 20 NE® (Biomeriux, France). La identificación de esta bacteria fue posteriormente confirmada mediante un ensayo PCR específico y la posterior secuenciación del ADN amplificado (Xia y cols., 2004). Por otra parte, se valoró la presencia de otros patógenos respiratorios en el pulmón como *Mycoplasma hyopneumoniae* o PCV2, mediante la realización de sendos ensayos PCR.

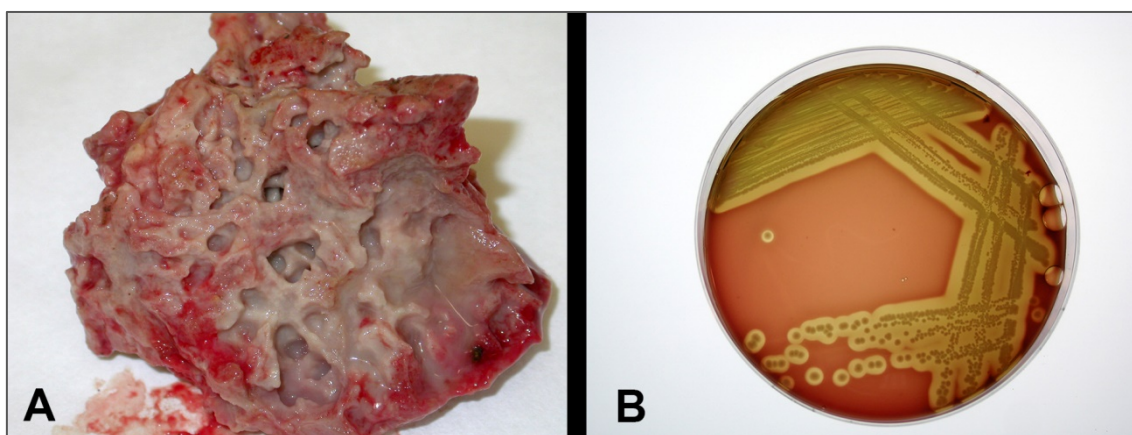


Imagen 28: A) Bronconeumonía con exudados purulentos hallada en animal con infección pulmonar por *Aeromonas hydrophila*. B) Cultivo puro de *A. hydrophila* obtenido de material procedente del pulmón del jabalí afectado.

Una vez detectada la presencia de *A. hydrophila* en el pulmón afectado, se realizó un estudio para valorar la presencia de este microorganismo en el tracto respiratorio de los jabalíes de la finca y su posible papel como patógeno respiratorio. Para ello se obtuvieron un total de 12 hisopos nasales procedentes de animales vivos que vivían en la zona de la granja (Imagen 29) y 34 hisopos pulmonares obtenidos de animales que fueron abatidos en la cacería celebrada en la finca ese mismo año. Todos los hisopos fueron cultivados en medio de cultivo específico (*Aeromonas isolation agar*, Fluka Sigma Aldrich, España) para la detección de *Aeromonas* y las colonias sospechosas fueron confirmadas como *A. hydrophila* mediante PCR.

Simultáneamente, se realizó una valoración histológica de los 34 pulmones incluidos en el estudio. Para ello, de cada animal, se fijó en formaldehído un trozo de

parénquima pulmonar procedente de los lóbulos apicales. Estas secciones fueron procesadas siguiendo el protocolo estándar empleado para muestras histológicas. Las secciones de cada pulmón fueron valoradas atendiendo a 5 parámetros histológicos: presencia de células inflamatorias en septos alveolares, hiperplasia del BALT, presencia de exudados alveolares, inflamación en lámina propia de bronquios y bronquiolos y necrosis en epitelio de bronquios y bronquiolos. Todos estos parámetros fueron valorados en un rango de 0 a 6 dependiendo de su gravedad (Landolt y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004). La puntuación media obtenida para cada uno de ellos fue comparada entre los animales infectados y no infectados con *A. hydrophila* mediante pruebas estadísticas no paramétricas (U de Mann-Whitney).



Imagen 29: Toma de muestras con hisopos estériles en uno de los jabalíes vivos que fueron muestreados durante este estudio.

Aeromonas hydrophila fue hallada en 3 de los 34 pulmones estudiados y en 2 de los 12 hisopos nasales. Las lesiones histológicas encontradas en los pulmones estudiados fueron similares tanto en los animales infectados con *A. hydrophila* como en los animales no infectados (Tabla 10).

Muy probablemente las lesiones neumónicas encontradas en el animal que originó el estudio fueron provocadas por *A. hydrophila*, ya que este microorganismo fue detectado en cultivo puro y no se aislaron otros patógenos respiratorios. A pesar

de esto, la presencia de *A. hydrophila* no parece estar correlacionada con la presencia de lesiones neumónicas en animales adultos.

Tabla 10: Valores medios obtenidos en los diferentes parámetros lesionales evaluados en animales infectados y no-infectados con *A. hydrophila*.

Parámetros lesionales	Aislamiento de <i>A. hydrophila</i>			
	Infectados <i>A. hydrophila</i> (n=3)*		No-Infectados <i>A. hydrophila</i> (n=31)	
	Animales con lesión	Media	Animales con lesión	Media
<i>Inflamación de la lámina propia de bronquios y bronquiolos</i>	1 (33.3 %)	1.33	13 (41.9 %)	1.03
<i>Infiltrado inflamatorio en septos alveolares</i>	2 (66.7 %)	1.67	8 (25.8 %)	0.48
<i>Exudados inflamatorios en vías aéreas</i>	3 (100 %)	1.33	7 (22.6 %)	0.52
<i>Hiperplasia del BALT</i>	3 (100 %)	2.33	18 (58.1 %)	1.39
<i>Necrosis epitelial en bronquios y bronquiolos</i>	0 (0 %)	0	0 (0 %)	0

Así, el rol que *A. hydrophila* tiene como patógeno respiratorio en el jabalí no está claro y todo parece indicar que la aparición de lesiones neumónicas en animales infectados podría estar condicionada por otros factores como el estrés, la edad o estados de inmunosupresión, al igual que ocurre con otros patógenos respiratorios (Pijoan, 2006). La edad podría ser un factor clave en este aspecto, ya que el animal que presentó lesiones neumónicas asociadas al aislamiento de *A. hydrophila* era un jabalí joven de 5 meses, mientras que los animales mayores de 2 años no presentaron lesiones. En otras especies animales y en el hombre, el papel de *A. hydrophila* como patógeno respiratorio tampoco está totalmente claro y también se piensa que su patogenia puede verse influida por la presencia de otros factores (Hur y cols., 1995; Alonso y cols., 1996).

Aeromonas hydrophila ha sido asociada con gran cantidad de cuadros clínicos en humanos, tales como diarreas, septicemias o meningitis (Janda y cols., 2010). Los datos disponibles sugieren que las principales rutas de contagio de *A. hydrophila* son a través del consumo de agua o comida contaminadas (Janda y cols., 2010). En este

sentido, la presencia de *A. hydrophila* en el jabalí podría suponer un riesgo sanitario ya que, debido a las condiciones en las que se produce el faenado de estos animales, las probabilidades de contaminación de las canales con este microorganismo serían bastante elevadas.

ISOLATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA* IN THE RESPIRATORY TRACT OF WILD BOAR: PATHOLOGIC IMPLICATIONS

David Risco, D.V.M., Pedro Fernández-Llario, Ph.D, Jesús M. Cuesta, D.V.M., José M. Benítez-Medina, D.V.M, Waldo L. García-Jiménez, D.V.M, Remigio Martínez, D.V.M., Pilar Gonçalves, D.V.M., Javier Hermoso de Mendoza, Ph.D, Luis Gómez, Ph.D, and Alfredo García, Ph.D.

Abstract: *Aeromonas hydrophila* has been repeatedly reported as an animal pathogen. This study describes a case of a wild boar piglet in Spain with severe purulent pneumonia caused by *A. hydrophila*. To confirm the presence of *A. hydrophila* in the respiratory tract of wild boars from the same region, lung samples from 34 adult hunted animals and nasal samples from 12 live animals were collected and cultured in selective medium. Lung lesions were studied in hunted wild boars to determine the presence of *A. hydrophila* and to assess its role as a possible respiratory pathogen in wild boars. *A. hydrophila* was isolated in 10.87% of the animals studied (8.82% of the dead animals and 16% of the live animals). However, its presence in the lungs of adults could not be correlated with the lesions found. Thus, the role of *A. hydrophila* as a respiratory pathogen is likely to be influenced by other factors, such as age, immunologic status, or coinfection with other pathogens. As a zoonotic pathogen, the presence of *A. hydrophila* in wild boars may pose a potential risk to people who consume their flesh.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, lung, *Sus scrofa*, wild boar, zoonoses.

BRIEF COMMUNICATION

Aeromonas hydrophila is a widespread facultative anaerobic gram-negative bacillus.⁶ This bacterium is a well-known pathogen in fish, amphibians, and reptiles.⁶ Furthermore, the pathogenic potential of *A. hydrophila* alone or in combination with various infectious and noninfectious cofactors has also been proved in humans and other warm-blooded animals.⁸ *A. hydrophila* has been associated with diarrhea in piglets,⁴ pneumonia in goats,¹ abortion in mares,⁵ and septicemia in rabbits.¹¹

Although *A. hydrophila* has been detected and correlated with illness in a great number of animal species, it has never been isolated in wild boar. In this study, the isolation of *A. hydrophila* from a dead wild boar piglet with severe pneumonic lesions is described.

Outbreaks of many infectious diseases, rarely described before in wild boars, such as swine erysipelas or chlamydiosis, are being detected currently on wild boar farms.^{13,14} These outbreaks usually have clinical signs and features different from the documented signs previously described in domestic pigs and include high mortality rates.¹⁴ Therefore, the discovery of infectious pathogens not previously reported in this species

should be examined. Thus, a survey was conducted to verify the presence of *A. hydrophila* in the respiratory tract of wild boars and to assess its possible role as a respiratory pathogen.

The study was conducted on a game estate located in Luciana (Ciudad Real, Spain), an area with a continental thermo-Mediterranean climate (hot dry summers and mild to moderately wet winters) and with vegetation mainly consisting of scrubland (*Cistus* sp.) and evergreen oak forests (*Quercus suber*). The home range of this boar population is divided into two very different sections: a "free-ranging area" of about 3,000 hectares, with 350 wild boars living without restrictions on mobility or ingestion of natural forages; and a second area consisting of a fenced-off enclosure within the former area, where animals are fed with a commercial food specific for wild boar (JB-4®, INALSA S.A., Torralba de Calatrava, Ciudad Real 13270, Spain). This area of about 5 hectares with 28 adult wild boar (20 sows and 8 boars) acts as an intensive breeding farm that supplies young animals to the free-ranging area. There is a system of coordinated gates to allow the separation and handling of the animals when required.

A 5-mo-old wild boar piglet was found moribund in the free-ranging area in July 2009, showing depression, dyspnea, and nasal discharge. The animal was collected by a farm worker and died soon afterwards. A detailed necropsy was performed, and a severe bronchopneumonia with purulent exudate was the only prominent macroscopic lesion (Fig. 1). Lung smears were

From the Departamento Patología Infecciosa, Facultad de Veterinaria, Avda. de la Universidad s/n, 10.003 Cáceres, Spain (Risco, Fernández-Llario, Cuesta, Benítez-Medina, García-Jiménez, Martínez, Gonçalves, Hermoso de Mendoza, Gómez, García). Correspondence should be directed to Dr. Risco (riscope@unex.es).

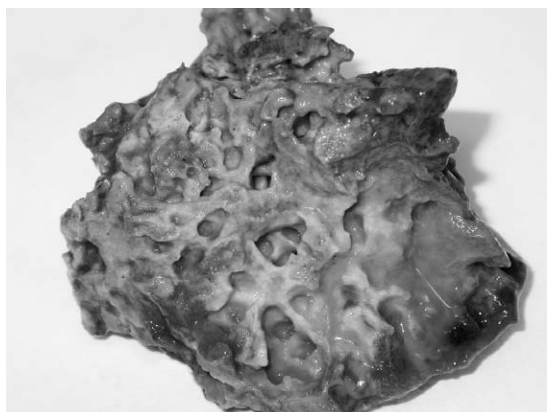


Figure 1. Purulent pneumonia with presence of profuse exudates in the lung of a 5-mo-old wild boar infected by *Aeromonas hydrophila*.

stained with Gram stain and microscopically examined. Smears showed a large number of gram-negative rods. Aerobic cultures on blood agar and chocolate agar yielded a pure culture of colonies identified as *A. hydrophila* by the biochemical identification system API20NE® (Biomérieux Spain S.A, Madrid, Madrid 28034, Spain). To confirm the *A. hydrophila* identification, a specific polymerase chain reaction (PCR) was used,¹⁵ and its amplification product was purified and sequenced. A Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) homology search revealed that the 208-bp nucleotide sequence of the amplified product matched the partial β -hemolysin gene of *A. hydrophila* Ah-J1 (DDBJ accession No. AB021152). An assessment of the presence of other respiratory pathogens using specific PCR assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*² and porcine circovirus type 2³ was conducted on DNA extracted from the lungs, which yielded negative results. DNA was extracted using a commercial kit. QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex RH10 9NQ, United Kingdom).

After detecting *A. hydrophila* in this animal, lung swabs from 34 adult wild boar (older than 2 yr) hunted in the free-ranging area in January 2010 and nasal cavity swabs from 12 live wild boar in the intensive area in April 2010 were examined. All the animals sampled were apparently healthy. These samples were obtained to verify the presence of this microorganism in the respiratory tract of the wild boar population and assess its role as a respiratory pathogen. Lung swabs were aseptically obtained in the lab, whereas the nasal swabs

were obtained introducing the swab in the nasal cavity of the wild boar and carefully avoiding contact with other surfaces. Samples were cultured on *Aeromonas* isolation agar (Fluka Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Madrid 28760, Spain) at 37°C in air for 24–48 hr. *A. hydrophila* suspect colonies were further analyzed on the basis of standard bacteriologic procedures, including Gram staining, oxidase and catalase reactions, hemolytic phenotype on blood agar medium, oxidation–fermentation test, and growth on McConkey agar and confirmed by the previously described PCR.

Simultaneously, sections from cranial lobes of each lung were collected for histopathologic study. These samples were processed following standard procedures and stained with hematoxylin and eosin. Lung sections were subject to blind examination (without knowing the microbiologic study results) and were scored on a scale of 0 to 6 (0, normal; 1, mild multifocal; 2, mild diffuse; 3, moderate multifocal; 4, moderate diffuse; 5, severe multifocal; and 6, severe diffuse) for five histopathologic parameters. These parameters were presence of alveolar septal infiltration with inflammatory cells, peribronchial lymphoid hyperplasia, amount of alveolar exudates, amount of inflammation in the lamina propria of bronchi and bronchioles, and presence of necrosis in epithelial cells of bronchi and bronchioles.¹⁰ Mean scores obtained for each of the studied histopathologic parameters were compared between the group of animals in which *A. hydrophila* was isolated and the group of animals in which it could not be isolated. Due to the characteristics of sampling, a nonparametric test (Mann–Whitney *U*-test) was used to compare means between groups. All calculations were performed using the SPSS 15 software package (SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA).

Of all samples obtained, only five isolates of *A. hydrophila* were obtained from selective medium. Three of the isolates were pure cultures from lungs, and two of the isolates were from nasal cavities. Thus, *A. hydrophila* was found in 10.87% of animals studied (8.82% of the dead animals and 16% of the live animals). All of the isolates obtained showed β -hemolysin phenotype and were PCR positive for the presence of the hemolysin-encoding gene as virulent factor.¹⁵ The results of the histopathologic study are summarized in Table 1. In agreement with the absence of apparent gross lesions in the lungs sampled, only mild cases of alveolar septal infiltration with inflammatory cells, inflammation

Table 1. Mean scores obtained in histopathologic study carried out in lungs from *Aeromonas Hydrophila*-infected and noninfected animals.

Histopathologic parameters	<i>A. hydrophila</i> positive (n = 3)*		<i>A. hydrophila</i> negative (n = 31)	
	Animals showing lesions (%)	Mean score	Animals showing lesions (%)	Mean score
Inflammation in the lamina propria of bronchi and bronchioles	1 (33.3)	1.33	13 (41.9)	1.03
Septal infiltration with inflammatory cells	2 (66.7)	1.67	8 (25.8)	0.48
Presence of alveolar exudates	3 (100)	1.33	7 (22.6)	0.52
Peribronchial lymphoid hyperplasia	3 (100)	2.33	18 (58.1)	1.39
Necrosis in epithelial cells	0 (0)	0	0 (0)	0

* *A. hydrophila* isolated from lungs in *Aeromonas* isolation agar and confirmed by polymerase chain reaction.

in the lamina propria of bronchi, alveolar exudates mainly formed by neutrophils and macrophages, and peribronchial lymphoid hyperplasia were found in a percentage of the studied animals (Table 1). The mean scores obtained in each histologic parameter studied did not show differences between *A. hydrophila*-infected and -noninfected animals.

The pneumonic lesions found in the affected animal were most likely caused by *A. hydrophila* because this microorganism was isolated in pure culture in the lungs of this animal and other respiratory pathogens were not detected. Despite this observation, *A. hydrophila* could not be correlated with lung lesions found in adult wild boar. Infected lungs did not show typical pathologic patterns, and it was not possible to establish significant differences between histopathologic evidence found in *A. hydrophila*-infected and non-infected lungs. Thus, the role of *A. hydrophila* as a respiratory pathogen in wild boars remains unclear, and the development of tissue damage by this agent might depend on other factors, such as stress, age, or immunosuppression. This fact has been previously described in other respiratory pathogens, such as *Pasteurella multocida*.¹² The clinical signs produced by this pathogen depend on the immunologic status of the infected animals and the presence of other infectious agents, such as *Mycoplasma hyopneumoniae* or pseudorabies virus.¹² Age might also be an important factor because the animal that showed a severe purulent pneumonia caused by *A. hydrophila* was only 5 mo old, whereas the animals subsequently studied were older than 2 yr and did not show pulmonary lesions when *A. hydrophila* was isolated from their lungs. However, more research assessing the presence of *A. hydrophila* in younger wild boars

is necessary to determine its role in clinical disease.

The role of *A. hydrophila* as a respiratory pathogen in other animals and humans is also uncertain. Although *A. hydrophila* has been associated with a few human cases of necrotizing pneumonia⁹ and lung abscessation,⁷ it is also suggested that the consequences of these infections could be influenced by several factors, including the immune status of the affected individuals.⁸

A. hydrophila has also been associated with several other human infections, such as acute gastroenteritis, septicemia, cellulitis, colitis, meningitis, wound infections, and, less frequently, urinary tract and respiratory infections.⁸ Most data available suggest that aeromonad infections in humans are mainly acquired via contact with contaminated drinking water or through the ingestion of foods (produce, dairy, or meats) that are naturally exposed to aeromonads through irrigation processes or other "farm-to-table" operations.⁸ Therefore, the presence of *A. hydrophila* in the respiratory tract of wild boars might pose a risk for people through the consumption of their flesh. Wild boar butchering is an open process with many opportunities for the flesh to become contaminated with potentially pathogenic bacteria. The presence of *A. hydrophila* in the respiratory tract of wild boar makes contamination with this microorganism more likely.

Acknowledgments: This study was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España) PS0900513, Regional Government of Extremadura (PDT09A046 and GRU10142) and FEDER. D. Risco has a FPU grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2009-0704).

LITERATURE CITED

1. Alonso, J. M., J. Rey, J. Hermoso de Mendoza, and M. Hermoso de Mendoza. 1996. *Aeromonas hydrophila*: un agente inhabitual de neumonía en cabras. *Medicina Veterinaria* 13: 439–441.
2. Calsamiglia, M., C. Pijoan, and A. Trigo. 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 246–251.
3. Cságola, A., S. Kecskeméti, G. Kardos, I. Kiss, and T. Tuboly. 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch. Virol.* 151: 495–507.
4. Dobrescu, L. 1978. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a case of piglet diarrhoea. *Zentralbl. Veterinarmed. Reihe B* 25: 713–718.
5. Fontaine, M., C. Collobert-Laugier, and G. Tariel. 1996. Abortion and fetal death of infectious origin in the mare. *Summa* 13: 57–62.
6. Gray, S. J. 1984. *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *J. Hyg.* 92: 365–375.
7. Hur, T., K. C. Cheng, and J. M. Hsieh. 1995. *Aeromonas hydrophila* lung abscess in a previously healthy man. *Scand. J. Infect. Dis.* 27: 295.
8. Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 35–73.
9. Nagata, K., Y. Takeshima, K. Tomii, and Y. Imai. 2011. Fulminant fatal bacteremic pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a non immunocompromised woman. *Int. Med.* 50: 63–65.
10. Opriessnig, T., E. L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41: 624–640.
11. Paniagua, C., J. L. Argüello-Villares, M. A. Arias, and M. Herreros. 1998. *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 201: 423–430.
12. Pijoan, C. 2006. Pneumonic pasteurellosis. In: B. Straw, J. Zimmermann, S. D’Allaire, and D. J. Taylor (eds.). *Diseases of Swine*, 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. Pp. 719–726.
13. Risco, D., A. García, P. Fernández-Llario, W. L. García, J. M. Benítez, P. Gonçalves, J. M. Cuesta, L. Gómez, J. Rey, and J. H. De Mendoza. 2013. Ocular lesions associated with *Chlamydia suis* in a wild boar piglet (*Sus Scrofa*) from a semi-free range population in Spain. *J. Zoo Wildl. Med.* 44: 159–162.
14. Risco, D., P. F. Llario, R. Velarde, W. L. García, J. M. Benítez, A. García, F. Bermejo, M. Cortés, J. Rey, J. H. De Mendoza, and L. Gómez. 2011. Outbreak of swine erysipelas in a semi-intensive wild boar farm in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 58: 445–450.
15. Xia, C., Z. H. Ma, M. H. Rahman, and Z. G. Wu. 2004. PCR cloning and identification of the β -haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture* 229: 45–53.

Received for publication 16 January 2013

Discusión General

6. Discusión General

En los últimos años, muchas de las fincas dedicadas a la caza del jabalí han experimentado grandes cambios. En este tiempo se han explorado nuevos sistemas de producción, alimentación y manejo de estos animales con la finalidad de lograr un número satisfactorio de jabalíes a los que abatir durante el desarrollo de las acciones cinegéticas realizadas (Gortázar y cols., 2006).

Sin embargo, los conocimientos referentes a los aspectos sanitarios no han evolucionado tan rápidamente en este tipo de fincas. Así, aspectos como cuáles son las enfermedades más importantes que pueden afectar al jabalí en estos nuevos escenarios epidemiológicos o productivos, o cómo se combaten y previenen dichas enfermedades, son aún desconocidos. En este sentido, algunos de los trabajos presentados en esta tesis doctoral describen enfermedades infecciosas que pueden provocar mortalidad en el jabalí y exploran la aplicabilidad de medidas para controlar los efectos adversos de las mismas.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han detectado brotes de enfermedades causados por algunos de los patógenos más típicos que afectan al porcino doméstico, como *Erisipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus* o *Chlamydia suis*. Sin embargo, también se hallaron mortalidades provocadas por otros agentes infecciosos menos frecuentes como *Aeromonas hydrophila*.

Este último microorganismo fue asociado a un cuadro neumónico grave que provocó la muerte de un joven jabalí. Además, fue hallado en el tracto respiratorio de un porcentaje de la población de individuos adultos pertenecientes a la misma finca. Sin embargo, la importancia de *A. hydrophila* como patógeno respiratorio primario en estos animales adultos parece ser escasa, ya que su presencia en pulmón no se asoció con la observación de lesiones neumónicas. La existencia de infecciones respiratorias por este agente en el jabalí podría estar favorecida por la vinculación que este animal

tiene con los ambientes acuáticos, en los cuales lleva a cabo acciones tan importantes como el baño, que cumple varias funciones en la vida del jabalí (Fernández-LLario, 2005). Durante este rito, el individuo entra en contacto con depósitos naturales de agua generalmente estancada en los que la presencia de *A. hydrophila* es frecuente (Janda y cols., 2010). Este tipo de ambientes ya ha sido sugerido como posible fuente de contagio en otros casos de infecciones respiratorias por *A. hydrophila* en mamíferos (Alonso y cols., 1996).

La gran mayoría de los patógenos previamente mencionados habían sido detectados con anterioridad en el jabalí. Así, por ejemplo, agentes como *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus suis* o *Chlamydia suis*, habían sido hallados en jabalíes de nuestro país mediante el estudio de animales abatidos en monterías (Salinas y cols., 2009; Closa-Sebastiá y cols., 2011; Sánchez del Rey y cols., 2014). Sin embargo, poco se conocía acerca de sus repercusiones clínicas en esta especie animal. Los trabajos realizados durante esta tesis en los que se describen casos clínicos provocados por estos agentes, han permitido ampliar notablemente los conocimientos sobre este aspecto, dando a conocer la clínica y las lesiones que estos microorganismos producen en el jabalí. Este hecho pone de manifiesto la utilidad de este tipo de estudios descriptivos a la hora de ampliar los conocimientos acerca de los agentes infecciosos que afectan a este suido salvaje.

Generalmente, los patógenos responsables de los brotes aquí descritos produjeron cuadros clínicos y lesionales similares a los previamente definidos en cerdo doméstico. Sin embargo, en algunos casos se detectaron características peculiares no observadas con anterioridad. Así, por ejemplo, la presencia de lesiones oculares no había sido asociada a casos de mal rojo; mientras que la aparición de cuadros neumónicos con necrosis multifocal no había sido observada en animales afectados por epidermitis exudativa porcina. Conocer estas peculiaridades y las características de cada brote puede facilitar la realización de un correcto diagnóstico en futuros brotes de estas enfermedades en poblaciones de jabalí.

Por otra parte, algunos patógenos como *Brucella suis*, que produce importantes alteraciones en los índices reproductivos de granjas de porcino doméstico, parece no tener un fuerte impacto en la dinámica poblacional del jabalí. Pese a que este microorganismo resultó altamente seroprevalente en las poblaciones estudiadas y se hallaron cuadros de orquitis en machos infectados, no se apreció un efecto significativo en los índices reproductivos a escala poblacional. Este hallazgo, junto con la aparición de lesiones que no habían sido previamente asociadas a determinados patógenos, demuestra que, aunque el jabalí y el cerdo son susceptibles a los mismos patógenos, las consecuencias clínicas y epidemiológicas producidas por estos agentes pueden ser muy distintas en ambas subespecies.

Las descripciones de los diferentes brotes de enfermedades incluidos en este trabajo, nacen fruto de la aparición de mortalidades naturales en diferentes poblaciones del jabalí del suroeste español durante los cuatro años de desarrollo de esta tesis (2010-2014). De este modo, podemos decir que las patologías aquí descritas, estarían dentro de las enfermedades infecciosas que con más frecuencia causan mortalidades en poblaciones de jabalí pertenecientes al área de estudio. Sin embargo, estas enfermedades suponen sólo una parte dentro del conjunto de patologías infecciosas que pueden afectar a este animal provocando un desenlace fatal, ya que durante estos años también se detectaron brotes de enfermedades infecciosas producidas por otros patógenos como *H. parasuis* (Cuesta y cols., 2013), *Salmonella cholerasuis* o *Escherichia coli* (Material en preparación). La descripción de estos últimos no ha sido incluida en este trabajo debido a que pertenecen a otras tesis doctorales actualmente en desarrollo.

Analizando el impacto poblacional que tuvieron las diferentes enfermedades mencionadas en este trabajo, podemos encontrar desde patologías que aparentemente sólo afectaron a un individuo de la población, como la epidermitis exudativa o la queratoconjuntivitis producida por *Chlamydia suis*, a brotes de enfermedades que ocasionaron mortalidades más elevadas, como la pasterelosis septicémica y el mal rojo. Esto nos podría dar una idea de la importancia relativa que cada uno de estos patógenos tendría a escala poblacional. Sin embargo, hemos de

tener en cuenta que el cálculo de las mortalidades en las poblaciones de jabalíes es una tarea complicada, ya que los cadáveres pueden quedar en zonas difícilmente accesibles para el hombre o ser rápidamente ingeridos por depredadores o por sus propios congéneres. Por lo tanto, es muy probable que algunas de las mortalidades descritas para estas enfermedades estén subestimadas.

La aparición de algunos de estos brotes estuvo precedida de la existencia de situaciones epidemiológicas que tradicionalmente favorecen el desarrollo de estas enfermedades en poblaciones de cerdo doméstico. Así, por ejemplo, el brote de mal rojo aconteció en una explotación en la que las condiciones higiénicas eran bastante deficientes y los animales presentaban elevadas cargas parasitarias. Igualmente, el brote de pasterelosis septicémica estuvo precedido por un cambio brusco en la meteorología consistente en la aparición de abundantes lluvias de una forma repentina. Estos hechos sugieren que la aparición de brotes de enfermedades infecciosas en el jabalí se ve influido por la presencia de factores predisponentes en las poblaciones. Por lo tanto, el análisis de posibles factores de riesgo presentes en cada finca (hacinamiento, estrés, coinfecciones, cambios ambientales, etc.) será útil a la hora de valorar determinados problemas sanitarios en esta especie, puesto que existen patologías que están asociadas a factores epidemiológicos muy concretos y su presencia nos puede encaminar a un diagnóstico acertado. Por otra parte, la aplicación de medidas de control enfocadas a la eliminación de este tipo de factores predisponentes podría ser interesante a la hora de luchar frente algunas patologías infecciosas que pueden afectar al jabalí.

En alguno de los brotes aquí descritos se aplicaron tratamientos con el objetivo de reducir sus efectos poblacionales. Así, durante los brotes de pasterelosis septicémica y de mal rojo se aplicó antibioterapia vía oral con el alimento. En ambos casos los resultados parecieron ser buenos ya que las bajas cesaron tras su administración. La elección del tratamiento aplicado en estos casos se basó en las recomendaciones terapéuticas descritas para cerdo doméstico. Sin embargo, debido a las características zootécnicas de la cría del jabalí hubo que realizar algunas modificaciones de los protocolos habituales. Por ejemplo, la opción terapéutica de

elección para el tratamiento de un brote de pasterelosis podría ser la aplicación de tetraciclina vía parenteral a todos los animales afectados o susceptibles (Register y cols., 2012). En este caso la utilización de esta vía no fue posible debido a las características de la finca y a la idiosincrasia básicamente salvaje de estos animales, por lo que hubo que administrar el antibiótico vía oral. Pese a esto, la antibioterapia dio lugar a los resultados esperados con un cese de las bajas. Esto demuestra que la aplicación de acciones terapéuticas basadas en lo descrito previamente en cerdos, aunque con adaptaciones a las características zootécnicas de las fincas de jabalíes, puede ser útil para tratamiento de ciertas enfermedades.

En este sentido, la aplicación de medidas de profilaxis frente a determinadas patologías infecciosas podría ser también útil en explotaciones de jabalíes. Tras el brote de mal rojo declarado en una de las fincas estudiadas se estableció un plan vacunal basado en la administración de una vacuna comercial destinada a cerdo doméstico. La ausencia de nuevos brotes de mal rojo en esta finca tras la instauración del plan vacunal sugiere que esta medida de profilaxis fue exitosa. Los efectos inmunológicos que esta vacuna produjo en la población de jabalíes no fueron comprobados (niveles de anticuerpos). Sin embargo, en otros estudios se ha comprobado que la utilización de vacunas frente a determinados agentes infecciosos como ADV da lugar a unos niveles de anticuerpos aceptables y que serían suficientes para garantizar la inmunidad de estos animales (Maresch y cols., 2012).

Al igual que ocurría con la administración de la antibioterapia, existen limitaciones a la hora de aplicar un programa vacunal en jabalíes, debido principalmente a las características zootécnicas de las explotaciones y al comportamiento de la especie. Estas características hacen que en muchos casos la administración parenteral de una vacuna sea una tarea imposible. Para solucionar esto se están estudiando protocolos de vacunación alternativos, sobre todo basados en la administración de vacunas orales mediante cebos. La eficacia de este tipo de protocolos ha sido probada con algunas vacunas específicas frente a ADV, *Mycobacterium bovis* o el virus de la peste porcina clásica (Kaden y cols., 2000; Ballesteros y cols., 2009; Maresch y cols., 2012). Los estudios experimentales han

demostrado la eficacia de algunas de estas vacunas en las condiciones de ensayo, dando lugar a una correcta producción de anticuerpos (Maresch y cols., 2012). Sin embargo, será necesario comprobar la eficacia de estas vacunas en situaciones de campo y diseñar estrategias de administración efectivas antes de comenzar a usar este tipo de medidas masivamente.



Imagen 30: Manejo para vacunación de rayones en explotación cinegética de jabalíes. A) Sistema de captura de rayones repleto de animales. B) Aplicación de vacuna vía parenteral en jabalí menor de 6 meses, el cual puede ser manejado con relativa facilidad para la aplicación de tratamientos parenterales.

Otra de las posibles estrategias para realizar vacunaciones en fincas de jabalíes sería la administración parenteral de estas a los sectores poblacionales más fácilmente manejables, es decir, en los animales más jóvenes. Actualmente, gran cantidad de fincas disponen de sencillos sistemas de captura que permiten manejar con relativa facilidad a los jabalíes de edades comprendidas entre uno y seis meses aproximadamente. La vacunación de estos animales en un momento adecuado (posterior a la disminución de los niveles de anticuerpos calostrales) podría proporcionarles una inmunidad suficiente como para superar con garantías los meses posteriores a la vacunación, que precisamente es el periodo de mayor riesgo para padecer muchas de las enfermedades infecciosas que pueden afectar al jabalí. Sin embargo, antes de comenzar a utilizar este tipo de estrategias vacunales habría que determinar algunas cuestiones, como la edad idónea a la que estos animales deben ser vacunados con el fin de evitar interferencias con los anticuerpos transferidos por la madre. Además, sería conveniente valorar la eficacia de protocolos de vacunación alternativos basados en la aplicación de una única dosis vacunal, evitando

revacunaciones periódicas, ya que la realización de cualquier manejo con este tipo de animales supone para ellos una situación de estrés importante.

Por otra parte, los resultados obtenidos en algunos de los trabajos presentados en esta tesis abren el camino a la aplicación de novedosas de medidas de control de enfermedades en jabalí, basadas en la lucha frente a patógenos concomitantes que podrían favorecer el desarrollo de una enfermedad concreta con graves implicaciones, como es la tuberculosis. En estos estudios se ha comprobado que altas prevalencias de PCV2 se asocian con la presencia de elevadas prevalencias de tuberculosis en poblaciones de jabalí. Además, los individuos que han tenido un contacto con PCV2, ADV y *Metastrongylus* spp. tienen más probabilidades de mostrar un cuadro generalizado de tuberculosis.

Estos cuadros generalizados han sido asociados con mayores cargas bacterianas y mayores niveles de excreción de micobacterias (Menin y cols., 2013), por lo que un mayor porcentaje de animales con lesiones generalizadas podría aumentar las prevalencias de esta enfermedad en las poblaciones de jabalíes y su difusión a otras especies susceptibles con las que interactúen. Por lo tanto, medidas sanitarias tales como desparasitaciones o vacunaciones frente a PCV2 y ADV, encaminadas a controlar los patógenos que favorecen el desarrollo de cuadros generalizados de tuberculosis, podrían resultar útiles a la hora de controlar esta enfermedad en el jabalí. Este hecho reduciría los riesgos de difusión de esta enfermedad al bovino, contribuyendo indirectamente al éxito de las campañas de saneamiento, comprometido en muchas áreas de extensivo por la presencia de reservorios silvestres, de los que el jabalí es el más activo en todo el centro y suroeste peninsular (Hermoso de Mendoza y cols., 2006). En cualquier caso, la viabilidad de este tipo de medidas enfocadas al control de los patógenos concomitantes que pueden influir en el desarrollo de la tuberculosis ha de ser examinada bajo condiciones controladas en futuras investigaciones, valorando su aplicabilidad antes de que se proponga su uso definitivo en las fincas de jabalíes.

Por otra parte, la eliminación previa de patógenos concomitantes como *Metastrongylus* spp. o los virus antes mencionados, podría favorecer el éxito de otras

medidas de control frente a la tuberculosis como la vacunación con vacunas vivas derivadas de la BCG u otras. Por ejemplo, la presencia de agentes parasitarios puede provocar una respuesta inmune sesgada hacia Th2 que impida una correcta inmunización frente a la tuberculosis después de la administración de la vacuna (Elias y cols., 2005a). Incluso, el hecho de administrar vacunas vivas como la BCG en forma de cebos o por otros procedimientos en animales inmunodeprimidos, podría generar enfermedad vacunal, es decir tuberculosis causada por BCG, de la que hay ejemplos en la especie humana (Paik y cols., 2011; Vera y cols., 2012). Por este motivo, la aplicación de medidas frente a patógenos concomitantes podría ser necesaria también, como requisito previo para el correcto funcionamiento de otras medidas de control directas frente a la tuberculosis.

El éxito de estas medidas basadas en el control de patógenos concomitantes podría tener una repercusión importante ya que este tipo de acciones pueden ser aplicadas en otros ámbitos sanitarios. Así, se ha comprobado que el desarrollo de enfermedades importantes como la tuberculosis humana o la malaria podrían estar influidas por la presencia de patógenos concomitantes, sugiriendo la posibilidad de realizar tratamientos frente a los mismos (Elias y cols., 2001; Lello y cols., 2013). En este sentido, el jabalí puede suponer un buen escenario experimental del cual se pueden extraer conclusiones importantes acerca de la utilidad de estas prometedoras medidas.

La interacción entre los diferentes patógenos que pueden infectar simultáneamente al jabalí podría verse reflejada en otros ámbitos más allá de la tuberculosis. Así, en uno de los estudios de esta tesis se demuestra cómo estos animales pueden estar coinfectados por algunos de los patógenos respiratorios más representativos en esta especie. Además, los animales que presentan estas infecciones mixtas producidas por virus y bacterias parecen presentar lesiones pulmonares más graves, lo que sugiere que, al igual que ha sido descrito en el cerdo doméstico (Opriessnig y cols., 2011), la interacción entre los diferentes patógenos respiratorios puede potenciar las lesiones producidas por ellos. Sin embargo, la realización de más estudios, incluyendo un mayor número de individuos, será necesaria para esclarecer

las relaciones que se establecen entre estos patógenos en condiciones naturales y comprender bajo qué circunstancias esas coinfecciones agravan la sintomatología respiratoria observada.

Además, en algunos de los estudios aquí presentados se plantea que la aplicación de medidas basadas en el manejo poblacional, podría ayudar a limitar el impacto sanitario que el jabalí tiene como reservorio de algunos patógenos. Así, se ha demostrado que las altas seroprevalencias frente a *Brucella suis* están relacionadas con elevadas densidades poblacionales, lo que sugiere que una reducción de las mismas mediante una mayor presión de caza u otros métodos, podría ser útil para disminuir la prevalencia de este patógeno en el jabalí. Este tipo de medidas ya han sido probadas para el control de algunas enfermedades en el jabalí como la tuberculosis o la enfermedad de Aujeszky (Boadella y cols., 2012), obteniéndose resultados satisfactorios en las circunstancias del estudio, lo que apoya la aplicabilidad de las medidas.

Finalmente, se puede concluir diciendo que los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis suponen un avance en los conocimientos acerca de los patógenos infecciosos que afectan al jabalí. Este avance se traduce en una mejor comprensión del impacto sanitario que determinados agentes infecciosos pueden tener en las poblaciones de jabalí, o en la propuesta de innovadoras medidas de lucha basadas en los conocimientos adquiridos y encaminadas a controlar importantes enfermedades que afectan a este animal. Sin embargo, futuras investigaciones centradas, por ejemplo, en comprobar la eficacia de las medidas de control aquí propuestas, o valorar el efecto de las coinfecciones con patógenos respiratorios, serán necesarias para completar el camino marcado por esta tesis doctoral.

Conclusiones

7. Conclusiones

1. Las poblaciones de jabalí de Extremadura presentan altas seroprevalencias frente a *Brucella suis*. Pese a esto, la presencia de este patógeno no parece alterar los parámetros reproductivos de los jabalíes lo suficiente como para tener un efecto negativo a escala poblacional.
2. Las altas seroprevalencias frente *Brucella suis* están positivamente correlacionadas con la densidad poblacional de jabalíes, lo que sugiere que medidas basadas en la reducción de la densidad de estos animales pueden ser útiles para bajar las prevalencias de este patógeno.
3. Los principales patógenos respiratorios que intervienen en el desarrollo del Complejo Respiratorio Porcino están presentes en las poblaciones de jabalíes del área de estudio. Algunos de estos agentes como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* o *Pasteurella multocida* se asocian con la presencia de lesiones neumónicas. La infección simultánea por varios de estos agentes (virus y bacterias) en un mismo animal es posible y parece estar asociada al desarrollo de cuadros neumónicos graves.
4. Las altas prevalencias de circovirus porcino tipo 2 se correlacionan positivamente con elevadas prevalencias de tuberculosis en poblaciones de jabalíes. Las infecciones con este virus favorecen además el desarrollo de patrones lesionales generalizados en los animales infectados por *Mycobacterium bovis*. La existencia de este tipo de patrones lesionales es más frecuente en fincas con elevadas prevalencias de tuberculosis.
5. El contacto con determinados patógenos como el circovirus porcino tipo 2, *Metastrongylus* spp. o el virus de la enfermedad de Aujeszky, influye en la gravedad y en la generalización de las lesiones encontradas en los jabalíes infectados por *Mycobacterium bovis*, sobre todo en animales jóvenes. Este hecho sugiere que las medidas sanitarias basadas en el control de estos agentes, como vacunar o desparasitar en su caso, podrían reducir la gravedad de los cuadros de tuberculosis y las prevalencias de esta

enfermedad en el jabalí, un efecto de potencial utilidad en el control de la tuberculosis en el bovino criado en extensivo.

6. Existen gran cantidad de patógenos típicos del cerdo tales como *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia suis*, *Streptococcus suis* o *Staphylococcus hyicus*, que pueden provocar mortalidades en poblaciones de jabalíes dando lugar a cuadros clínicos similares a los descritos en porcino doméstico. Otros patógenos no tan comunes como *Aeromonas hydrophila* también pueden provocar mortalidades en esta especie, al menos en edades juveniles.
7. Algunas infecciones provocadas por patógenos infecciosos típicos del cerdo, como *Erysipelothrix rhusiopathiae* o *Staphylococcus hyicus*, también pueden dar lugar a lesiones y signos clínicos que no han sido anteriormente descritos en porcino doméstico, tales como lesiones oculares en el primer caso, o lesiones neumónicas de carácter necrótico y multifocal en el segundo.
8. La aplicación de medidas sanitarias similares a las descritas para el control de algunas infecciones en cerdo doméstico, pero adaptadas a la idiosincrasia del jabalí o a su forma de explotación, como el uso de antibioterapia oral en brotes de pasterelosis septicémica o mal rojo, puede resultar útil para luchar frente a los patógenos que afectan a este suido salvaje.

Conclusions

8. Conclusions

1. Wild boar populations from Extremadura show high seroprevalences against *Brucella suis*. However, the presence of this pathogen does not seem to have a great impact on the overall reproductive parameters in wild boar populations.
2. High seroprevalence against *Brucella suis* is positively correlated with the wild boar population density, suggesting that control measures focused on the reduction of wild boar density could be useful to decrease the prevalence of *Brucella suis* in this wildlife species.
3. The main respiratory pathogens involved in the development of the Porcine Respiratory Disease Complex can infect wild boar populations from the studied area. Some of these agents, including *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* or *Pasteurella multocida* may lead to pneumonic lesions. Concurrent infections with viruses and bacteria occur and might be associated with the development of severe pulmonary lesions.
4. A high prevalence of porcine circovirus type 2 is positively correlated with high tuberculosis prevalence in wild boar populations from the studied area. Porcine circovirus type 2 infections may facilitate the development of lesions with higher severity in animals infected by *Mycobacterium bovis*.
5. The contact with porcine circovirus type 2, *Metastrongylus* spp. or Aujeszky's disease virus, may induce the development of more severe tuberculous lesions in wild boar infected by *Mycobacterium bovis*, mainly in young animals. This fact suggests that control measures such as vaccinations or deworming might reduce the presence of severe tuberculosis lesions and should be useful to reduce the prevalence of tuberculosis in wild boar populations. It may be potentially beneficial to control tuberculosis in free range cattle.

6. The infection by some common porcine pathogens as *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia suis*, *Streptococcus suis* or *Staphylococcus hyicus*, may lead to mortalities in wild boar populations causing similar clinical pictures to those previously described in domestic pigs. Other less common pathogens as *Aeromonas hydrophila* might also produce fatal infections in this species, at least in young animals.
7. The infections by some common porcine pathogens like *Erysipelothrix rhusiopathiae* or *Staphylococcus hyicus* may also produce lesions that had been never described in domestic pigs, like uveitis in *Erysipelothrix rhusiopathiae* infections or necrotic multifocal pneumonic lesions in a case of exudative epidermitis.
8. The application of control measures as antibiotherapy or vaccinations, based on those previously described for domestic pigs and adapted to specific characteristics of wild boar estates, can be useful to control infectious pathogens that infect wild boar.

Resumen

9. Resumen

El jabalí (*Sus scrofa*) es una especie salvaje en expansión. En España, este suido es una de las especies cinegéticas más relevantes, con una gran importancia económica en este sector. Esto ha provocado que en los últimos años se hayan empleado medidas de manejo muy variadas para incrementar las poblaciones de estos animales, que van desde la simple suplementación alimentaria o el vallado periférico de fincas, hasta la cría del jabalí en granjas intensivas similares a las de cerdo. La aplicación de este tipo de medidas aumenta la densidad de población, lo que puede favorecer la transmisión de patógenos infecciosos en el jabalí y la aparición de nuevas situaciones epidemiológicas que favorezcan el desarrollo de nuevas enfermedades para esta especie. Así, en los últimos años se han declarado brotes de enfermedades cuya existencia era desconocida hasta la fecha en poblaciones de jabalíes. Además, este suido se ha convertido en un reservorio importante de patógenos que afectan a los animales domésticos o a las personas. Todo esto confiere una gran importancia sanitaria al jabalí y crea la necesidad de determinar cuáles son los patógenos más importantes que pueden afectar a esta especie y elaborar medidas para limitar su impacto sanitario.

Esta tesis doctoral pretende definir la situación epidemiológica de algunos de los patógenos infecciosos más importantes que afectan al jabalí, determinando además el impacto sanitario que pudieran tener sobre esta especie y fijando medidas de control útiles para limitar sus repercusiones sanitarias. También se valora el efecto que pueden tener las infecciones simultáneas con diferentes patógenos en el desarrollo y la epidemiología de la tuberculosis en el jabalí.

Durante el desarrollo de este trabajo se detectaron mortalidades en poblaciones de jabalíes provocadas por patógenos infecciosos típicos del cerdo doméstico, como *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia suis*, *Staphylococcus hyicus* o *Streptococcus suis* serotipo II. Estos patógenos generalmente provocaron cuadros clínicos y lesionales similares a los descritos en cerdos domésticos.

Sin embargo, en algunos casos se observaron peculiaridades como el desarrollo de lesiones oculares en casos de mal rojo o la presencia de una neumonía necrótica multifocal en un caso de epidermitis exudativa. Los brotes provocados por algunos de estos patógenos como *E. rhusiopathiae* o *P. multocida* tuvieron un gran impacto en la población provocando elevadas mortalidades. Por otra parte, también se detectaron mortalidades causadas por patógenos menos frecuentes como *Aeromonas hydrophila*. Este patógeno provocó un cuadro neumónico con fatal desenlace en un jabalí joven. Además, su presencia en el tracto respiratorio se detectó en un porcentaje de la población de jabalíes y se determinó que su papel como patógeno respiratorio primario es limitado. La aplicación de medidas sanitarias basadas en la antibioterapia o en la profilaxis vacunal se empleó para resolver algunos de estos brotes, obteniendo resultados satisfactorios.

Mediante la realización de estudios basados en el análisis de jabalíes abatidos en monterías se detectó la presencia de importantes patógenos respiratorios en el jabalí como: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, circovirus porcino tipo 2 (PCV2), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) o el influenzavirus porcino (SIV). Las infecciones con algunos de estos patógenos como *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis* o *P. multocida* se relacionaron con la presencia de lesiones neumónicas. Además, se observó que las coinfecciones con varios de estos patógenos respiratorios pueden agravar las lesiones neumónicas producidas en infecciones simples.

Por otra parte, se determinó que *Brucella suis* es un patógeno que circula dentro de las poblaciones de jabalíes estudiadas, en las que se hallaron altas seroprevalencias frente a este patógeno. Además, se comprobó que su prevalencia estaba fuertemente relacionada con la densidad de jabalíes. Este patógeno se puede transmitir desde el jabalí al cerdo doméstico, principalmente en zonas donde el cerdo es criado en condiciones extensivas. En este tipo explotaciones, el control de la densidad de jabalíes podría ser útil para reducir la prevalencia de *B. suis* y su riesgo epidemiológico. Finalmente, en este estudio se determinó que la presencia de *B. suis* en las poblaciones de jabalí no altera los parámetros reproductivos en las mismas.

Por último, se observó que el contacto con determinados patógenos puede influir en el desarrollo de la tuberculosis y en la epidemiología de esta enfermedad en el jabalí. La prevalencia de tuberculosis en las poblaciones de jabalí estudiadas, resultó estar positivamente correlacionada con la prevalencia de PCV2. Además, se demostró cómo el contacto con PCV2, ADV y *Metastrongylus* spp. favorece el desarrollo de cuadros lesionales de tuberculosis generalizada. Este tipo de cuadros se asocian con lesiones menos encapsuladas y mayores cargas bacterianas, lo que podría favorecer la excreción de mycobacterias, lo que supone un riesgo epidemiológico. Por este motivo, la aplicación de medidas sanitarias encaminadas a combatir estos patógenos concomitantes (desparasitación, vacunación frente a PCV2 o ADV), pueden ser útiles en la lucha frente a la tuberculosis en jabalíes, reduciendo a su vez su difusión a otras especies con las que estos entren en contacto, especialmente el bovino.

Summary

10. Summary

In the recent decades, wild boar (*Sus scrofa*) populations have grown considerably in some countries. For example, in countries like Spain, wild boar hunting is a significant business. Therefore, estate managers try to maintain an overabundance of wild boar numbers in breeding or hunting estates, implementing management measures varying from simple food supplementation or fencing, to intensive breeding of these animals in farms. Higher densities in wild boar populations may pose increased risks for transmission of infectious diseases. In addition, more intensive managements may lead to new epidemiological scenarios leading to the development of new diseases or new clinical presentations of common ones. Thus, in recent years, many outbreaks of new diseases have been described in wild boar. Additionally, the wild boar has become an important reservoir of pathogens that may affect both domestic animals and humans. Therefore, defining the most common pathogens that infect wild boar and establishing control measures against them will be useful to limit their health impact.

This work aimed to study the epidemiological situation of common pathogens affecting wild boar that may have a huge health impact in this species. Furthermore, the implementation of control measures useful to limit the impact of some of the wild boar's common pathogens has been assessed. Finally, the effect that coinfections with different pathogens may have in the development and the epidemiology of tuberculosis in wild boar has been studied.

During this work, some mortality rates were detected in different wild boar populations. Mortality was related to different porcine pathogens such as *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia suis*, *Staphylococcus hyicus* or *Streptococcus suis* serotipe II. In general, infections with these agents lead to clinical manifestations and lesions similar to those previously described in domestic pigs. However some new features were also observed like ocular lesions in animals affected with erysipelas or a multifocal necrotic pneumonia in a case of exudative epidermitis.

Outbreaks caused by some of these common agents like *E. rhusiopathiae* or *P. multocida* had a great impact in wild boar populations leading to high mortality rates.

Other less common pathogens such as *Aeromonas hydrophila*, were also detected causing mortalities in wild boar populations. This pathogen caused a fatal respiratory infection in a wild boar piglet. In addition, *A. hydrophila* was detected in the respiratory tract of a high percentage of the wild boar population, but its role as a primary respiratory pathogen remains unclear. Different control measures based on vaccination or antibiotic administration were carried out in order to solve some of these outbreaks, obtaining satisfactory results.

The presence of some of the most important porcine respiratory pathogens as *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, porcine circovirus type 2 (PCV2), reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) or swine influenza virus (SIV), was detected in hunted wild boar. The infections with some of these agents were associated with pulmonary lesions. In addition, animals coinfecting with some of these respiratory pathogens were also found. These animals showed more severe lesions than infected animals with a single pathogen.

The presence of *Brucella suis* infections was also detected in wild boar populations. Animals included in this study showed high seroprevalence against this pathogen suggesting that *B. suis* is highly widespread in wild boar populations. The seroprevalences against this agent was correlated to the wild boar density. Thus, animals belonging to high dense populations showed a higher probability of being seropositive against *B. suis*. This fact suggests that measures focused on reducing wild boar density may be useful to control the seroprevalence of *Brucella* spp. in wild boar.

Finally, the results obtained in this work showed that the contact with different concomitant pathogens may drive the development of tuberculosis in wild boar. A higher prevalence of PCV2 infection in wild boar populations was related to higher prevalences of tuberculosis. In addition, contact with some pathogens like PCV2, ADV or *Metastrongylus* spp. facilitated the development of tuberculosis with a generalised

lesional pattern. These patterns are related to higher micobacterial load and hence, may increase their excretion and the risk of transmission. For this reason, measures focused on the control of these concomitant pathogens might be useful to control tuberculosis in wild boar populations, and reducing the spread of the pathogen to other species, especially cattle.

Anexo I

Índice de imágenes

11. Anexo I: Índice de imágenes

Imagen 1: Jabalíes adultos y crías de jabalí con su típica coloración a rayas que les proporciona el nombre de “rayones”	2
Imagen 2: Distribución geográfica de las formas salvajes y asilvestradas de <i>Sus scrofa</i> (Sjarmidi y cols., 1988). La figura no incluye las áreas de reciente colonización. .	3
Imagen 3: Hembra de jabalí plácidamente tumbada amamantando a su camada de rayones.	6
Imagen 4: Jabalí reposando en una zona embarrada a la que se le denomina “baña”	9
Imagen 5: El vallado perimetral es una de las medidas de manejo más extendidas en las fincas de jabalí.	11
Imagen 6: Hembra de jabalí amamantando a sus rayones en un núcleo zoológico de jabalíes dotado de instalaciones similares a las utilizadas para la cría del cerdo doméstico en condiciones intensivas.....	12
Imagen 7: Conjunto de jabalíes abatidos en una acción cinegética celebrada en una de las fincas estudiadas durante el desarrollo de esta tesis.	13
Imagen 8: Jabalíes en zonas urbanas. A) Jabalí intentando encontrar alimento en depósitos de basura situados en una zona periurbana. B) Jabalíes provocando daños en zona ajardinada de alguna ciudad.....	16
Imagen 9: Diagrama explicativo de los diferentes ámbitos que se ven afectados por la presencia de patógenos infecciosos en el jabalí.	17
Imagen 10: El jabalí comparte habitualmente zonas de campeo con el ganado doméstico criado en extensivo.....	22
Imagen 11: Número de trabajos científicos realizados sobre determinados patógenos infecciosos en jabalí y que habían sido publicados en los años 2000 (azul) y 2013 (rojo).	25
Imagen 12: Localización de las 11 fincas incluidas en este estudio. Las fincas estudiadas se encuadran en tres zonas diferentes: Sierra de San Pedro (SP), Monfragüe (MF) y Las Hurdes (LH). Los puntos de color negro representan las fincas con cerdo	

doméstico, mientras que los círculos de color gris representan las fincas sin cerdo doméstico. 42

Imagen 13: Dendrograma en el que se observa la relación genética hallada entre las diferentes cepas de *Brucella suis* biovar 2 aisladas durante el estudio. En él se puede observar como las cepas pertenecientes a la misma zona están más relacionadas genéticamente. 44

Imagen 14: “Tree model” obtenido al explorar los principales factores de riesgo que afectan a la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. 46

Imagen 15: Secciones histológicas de pulmones de jabalí teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE). A) Infiltrado inflamatorio en septos alveolares. 4x. B) Exudado inflamatorio en vías aéreas principalmente formado por macrófagos y neutrófilos. 20x. C) Hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquio. 10x. D) Inflamación de lámina propia de bronquio. 10x. E) Necrosis de células epiteliales de bronquiolo. 10x F) Lesión granulomatosa típica de tuberculosis. 4x..... 61

Imagen 16: Valores medios obtenidos en cada grupo de edad al llevar a cabo la valoración de los parámetros lesionales evaluados en este estudio. El asterisco indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos en distintos grupos de edad ($p < 0.05$). 62

Imagen 17: Secciones histológicas de pulmón de jabalí. A) Numerosos macrófagos en tejido linfoide asociado a bronquio positivos al ensayo inmunohistoquímico para la detección de PCV2. Complejo Avidina Biotina (ABC)/ Hematoxilina de Mayer. 40x. B) Macrófagos marcados positivamente con la técnica de hibridación *in situ* para detección de PCV2. 10 x. C) Células epiteliales y macrófagos marcados positivamente con la inmunohistoquímica realizada para detección de SIV. ABC/ Hematoxilina de Mayer. 40x. D) Agrupación de macrófagos inmunopositivos frente a PRRSV. ABC/ Hematoxilina de Mayer. 40x. E) Bacilo ácido-alcohol resistente dentro del citoplasma de una célula gigante multinucleada en una lesión granulomatosa típica de tuberculosis (asterisco). Tinción Zielh-Neelsen. 40x F) Nematodos pulmonares en el interior de un bronquio. HE. 10x. 65

Imagen 18: Lesiones macroscópicas de tuberculosis en jabalí. A) Jabalí con tuberculosis localizada mostrando lesión en nódulos linfáticos submandibulares. B)

Jabalí con tuberculosis generalizada mostrando múltiples lesiones de tuberculosis en el parénquima pulmonar.....	105
Imagen 19: <i>Tree model</i> en el que se muestran los principales factores de riesgo que explican la presencia de patrones lesionales generalizados de tuberculosis en el jabalí.	109
Imagen 20: Distribución por las zonas centro y oestes de España de las 20 fincas incluidas en este estudio	121
Imagen 21: Lesiones macroscópicas observadas en jabalíes afectados por mal rojo. A) Opacidad corneal. B) Presencia de hemorragias en vejiga de la orina sin contenido urinario.....	169
Imagen 22: Lesiones septicémicas encontradas durante el estudio histopatológico de los jabalíes afectados por mal rojo. a) Piel. Marcada hiperemia y presencia de trombos de fibrina (flecha). HE. Barra=100 µm. b) Riñón. Trombos de fibrina en capilares glomerulares y necrosis tubular con nefritis intersticial (flecha). HE. Barra=50 µm. c) Vejiga de la orina. Necrosis fibrinoide en pequeños vasos sanguíneos y presencia de colonias bacterianas. HE. Barra=100 µm. d) Coroides. Necrosis fibrinoide de pequeños vasos sanguíneos (flecha). HE. Barra=50 µm.	170
Imagen 23: Jabalí afectado por pasterelosis septicémica. a) Edema subcutáneo en área submandibular. b) Depósitos de fibrina en cavidad abdominal. c) Pulmón. Marcada congestión en vasos sanguíneos y septos alveolares. HE. 4x. d) Pulmón. Trombo en el interior de vaso sanguíneo. HE. 20x.	181
Imagen 24: Lesiones mostradas por jabalí infectado con <i>S. suis</i> . A) Lesiones neumónicas en lóbulos apicales de pulmón. B) Bronconeumonía asociada a edema alveolar. HE. 10x. C) Sistema nervioso central. Infiltrado inflamatorio periférico. HE. 20x. D) Sistema nervioso central. Infiltrado inflamatorio perivascular. HE. 20x.	189
Imagen 25: Lesiones macroscópicas halladas en jabalí afectado por epidermitis exudativa. A) Ulceración y separación del estuche córneo de las zonas blandas de las pezuñas. B) Necrosis con pérdida de tejido en las puntas de las orejas. C) Ulceración de la mucosa oral. D) Pulmón congestivo con presencia de múltiples focos necróticos y hemorrágicos.....	203

Imagen 26: Lesiones microscópicas halladas en jabalí afectado por epidermitis exudativa. A) Piel. Acantosis irregular e hiperqueratosis. HE. 4X. B) Piel. Pústulas intraepidérmicas con numerosos cocos gram-positivos. Tinción de Gram. Barra 100 μm . C) Pulmón. Foco necrótico en pulmón. En la esquina superior derecha se puede observar un detalle con la presencia de bacterias en el interior de un vaso sanguíneo. HE. 10X. D) Pulmón. Numerosos cocos gram-positivos en el interior de macrófagos alveolares. Tinción de Gram. Barra 10 μm 204

Imagen 27: Lesiones mostradas por el jabalí infectado por *Chlamydia suis*. A) Blefaritis con presencia de exudados oculares y marcada opacidad corneal. B) Pulmón. Bronconeumonía con presencia de exudados bronquiales e hiperplasia del BAL. HE. 20X. 214

Imagen 28: A) Bronconeumonía con exudados purulentos hallada en animal con infección pulmonar por *Aeromonas hydrophila*. B) Cultivo puro de *A. hydrophila* obtenido de material procedente del pulmón del jabalí afectado. 222

Imagen 29: Toma de muestras con hisopos estériles en uno de los jabalíes vivos que fueron muestreados durante este estudio. 223

Imagen 30: Manejo para vacunación de rayones en explotación cinegética de jabalíes. A) Sistema de captura de rayones repleto de animales. B) Aplicación de vacuna vía parenteral en jabalí menor de 6 meses, el cual puede ser manejado con relativa facilidad para la aplicación de tratamientos parenterales. 238

Anexo II

Índice de tablas

12. Anexo II: Índice de tablas

Tabla 1: Selección de los modelos planteados para explorar la influencia de <i>Brucella suis</i> biovar 2 (Bsbv2) en los parámetros reproductivos de 103 hembras y 85 machos de jabalí cazados en Extremadura. Para los parámetros reproductivos de las hembras (estado reproductivo y fertilidad potencial) se usaron modelos lineales generalizados (GLM) con una estructura de error concreta. En el caso del peso de los testículos se usaron modelos aditivos (GAM).	45
Tabla 2: Porcentaje de animales positivos frente a los diferentes patógenos respiratorios incluidos en este estudio en jabalíes de diferentes edades: rayones (0-6 meses), juveniles (6-12 meses), subadultos (12-24 meses) y adultos (más de 24 meses).	63
Tabla 3: Prevalencias de tuberculosis (TB) y PCV2 encontradas en las fincas objeto de estudio. Densidad relativa de jabalíes (animales cazados/100 ha) y porcentaje de animales que presentan TB generalizada.	106
Tabla 4: Selección de modelos para explorar la influencia de la prevalencia de PCV2 y el porcentaje de animales con lesiones generalizadas de TB (PGLP) en la prevalencia de tuberculosis de las 11 fincas estudiadas. Los modelos planteados fueron modelos lineales generalizados (GLM). K = número de parámetros incluidas las intersecciones. AICc = Criterio informativo de Akaike para muestras pequeñas, Δ_i = diferencia de AICc con respecto al mejor modelo, w_i = Peso específico del modelo..	108
Tabla 5: Porcentaje de animales positivos frente a los diferentes patógenos valorados en este estudio. Los porcentajes de animales positivos son también mostrados en las diferentes clases de edad.	123
Tabla 6: Frecuencia observada para cada una de las combinaciones de patógenos obtenidas al valorar <i>M. bovis</i> , <i>Metastrongylus</i> spp., <i>M. hyopneumoniae</i> (Mhyo), PCV2, SIV y ADV en los 165 animales incluidos en este estudio. "0" indica ausencia del patógeno o de anticuerpos específicos mientras que "1" indica que el patógeno está presente o la existencia de anticuerpos específicos frente a él. En negrita todas las combinaciones que aparecen en más de un 5 % de los animales estudiados	125

Tabla 7: *C-score* observado (O) y esperado (E) para la matriz de combinación de patógenos obtenida para los animales incluidos en este estudio pertenecientes a diferentes clases de edad. 125

Tabla 8: Pesos predictivos y porcentaje de la varianza explicados por cada uno de los patógenos incluidos en el modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales. El peso predictivo indica la aportación de cada uno de los patógenos al primer componente estadístico obtenido (23.94 % de la varianza explicada). 126

Tabla 9: Número de animales encontrados muertos durante los días en los que transcurrió el brote de pasterelosis septicémica. 180

Tabla 10: Valores medios obtenidos en los diferentes parámetros lesionales evaluados en animales infectados y no-infectados con *A. hydrophila*. 224

Anexo III

Índice de abreviaturas

13. Anexo III: Índice de abreviaturas

ABC: Complejo Abidina Biotina	GAM: Modelos aditivos generales
ADN: Ácido Desoxiribonucleico	GLM: Modelos lineales generales
ADV: Virus de la Enfermedad de Aujeszky	Ha: Hectárea
AIC: Criterio informativo de Akaike	HE: Hematoxilina-Eosina
AICc: Criterio informativo de Akaike corregido	IL12: Interleukina 12
ARN: Ácido ribonucleico	JCR: <i>Journal Citation Report</i>
BALT: Tejido linfoide asociado a bronquios	LH: Las Hurdes
Bsbv2: <i>Brucella suis</i> biovar 2	LVTB: Lesiones visibles compatibles con tuberculosis
Bv: Biovar	MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
CRP: Complejo Respiratorio Porcino	MF: Monfragüe
E: Esperado	MLVA: <i>Multiple-locus variant-repeat assay</i>
ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas	O: Observado
ERIC-PCR: <i>Enterobacteriaal repetitive insertion consensus</i>	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
	PCV2: Circovirus porcino tipo 2

PGLP: Porcentaje de animales con patrón lesional generalizado

PLSr: Regresión por mínimos cuadrados parciales

Ppm: Partes por millón

PPV: Parvovirus porcino

PRRSV: Virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino

SIV: Influenzavirus porcino

SP: Sierra de San Pedro

Spp: Especie

TB: Tuberculosis

Th: *T helper*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Wi: Peso específico de akaike

γ -IFN: Interferon γ

Δi : Incremento en el índice de Akaike

Referencias Bibliográficas

14. Referencias bibliográficas

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., 1997. Association between Production of Fibrinolysin and Virulence of *Staphylococcus hyicus* in Relation to Exudative Epidermitis in Pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* 38, 295-297.
- Abaigar, T., 1990. Características biológicas y ecológicas de una población de jabalíes (*Sus scrofa* L.) en el SE Ibérico. Universidad de Navarra, Pamplona.
- Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortázar, C., Höfle, U., Fernández-De-Mera, I.G., Amos, W., 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology* 14, 3209-3217.
- Al Dahouk, S., Flèche, P.L., Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H.C., Tomaso, H., Vergnaud, G., Neubauer, H., 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *Journal of Microbiological Methods* 69, 137-145.
- Algers, B., Blokhuis, H.J., Bøtner, A., Broom, D.M., Costa, P., Domingo, M., Greiner, M., Hartung, J., Koenen, F., Müller-Graf, C., Mohan, R., Morton, D.B., Osterhaus, A., Pfeiffer, D.U., Roberts, R., Sanaa, M., Salman, M., Sharp, J.M., Vannier, P., Wierup, M., 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *The EFSA Journal* 1144, 1-112.
- Alonso, J.M., Rey, J., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., 1996. *Aeromonas hydrophila*: un agente inhabitual de neumonía en cabras. *Medicina Veterinaria* 13, 439-441.
- Allepuz, A., Casal, J., Napp, S., Saez, M., Alba, A., Vilar, M., Domingo, M., González, M.A., Durán-Ferrer, M., Vicente, J., Álvarez, J., Muñoz, M., Sáez, J.L., 2011. Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006-2009). *Preventive Veterinary Medicine* 100, 44-52.
- Andersen, F.M., Pedersen, K.B., 1995. Brucellosis. A case of natural infection of a cow with *Brucella suis* biotype 2. *Dansk Veterinaertidsskrift* 78, 408.
- Avagnina, A., Nucera, D., Grassi, M.A., Ferroglio, E., Dalmaso, A., Civera, T., 2012. The microbiological conditions of carcasses from large game animals in Italy. *Meat Science* 91, 266-271.
- Ballesteros, C., Garrido, J.M., Vicente, J., Romero, B., Galindo, R.C., Minguijón, E., Villar, M., Martín-Hernando, M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2009. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine* 27, 6662-6668.

- Barasona, J.A., VerCauteren, K.C., Saklou, N., Gortázar, C., Vicente, J., 2013. Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction. *Preventive Veterinary Medicine* 111, 42-50.
- Becker, A., Lutz-Wohlgroth, L., Brugnera, E., Lu, Z.H., Zimmermann, D.R., Grimm, F., Grosse Beilage, E., Kaps, S., Spiess, B., Pospischil, A., Vaughan, L., 2007. Intensively kept pigs pre-disposed to chlamydial associated conjunctivitis. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* 54, 307-313.
- Belden, R.C., Pelton, M.R., 1976. Wallows of the european wild hog in the mountains of East Tennessee. *Journal of Tennessee Academy of Science* 51, 91-93.
- Bengis, R.G., Kock, R.A., Fischer, J., 2002. Infectious animal diseases: The wildlife/livestock interface. *OIE Revue Scientifique et Technique* 21, 53-65.
- Black, T.C., 1946. Coexistent hookworm and tuberculosis. *Southern Medical Journal* 39, 881-884.
- Boadella, M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2012. Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine* 107, 214-221.
- Boehm, M., White, P.C.L., Chambers, J., Smith, L., Hutchings, M.R., 2007. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. *Veterinary Journal* 174, 260-276.
- Boel, M., 2010. Complex interactions between soiltransmitted helminths and malaria in pregnant women on the Thai-Burmese border. *PLoS Neglected and Tropical Diseases* 4, e887.
- Bollo, E., Ferroglio, E., Dini, V., Mignome, W., Biolatti, B., Rossi, L., 2000. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Lymph Nodes of Wild Boar (*Sus scrofa*) by a Target-Amplified Test System. *Journal of Veterinary Medicine B/Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe B* 47, 337-342.
- Bordes, F., Morand, S., 2011. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology* 1, 7346.
- Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., Thacker, E.L. 2002. Porcine Respiratory Disease Complex, In: Brogden KA, G.J. (Ed.) *NCBI Bookshelf*. ASM Press, Washington.
- Brooke, C.J., Riley, T.V., 1999. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 48, 789-799.

- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Parasitology* 83, 575-583.
- Cabrera, A., 1914. Fauna Ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Saugar, J.M., Frontera, E., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Serrano, F.J., Fuentes, I., 2013. Congenital toxoplasmosis in wild boar (*Sus scrofa*) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. *Journal of Wildlife Diseases* 49, 1019-1023.
- Cameron, R.D.A., O'Boyle, D., Frost, A.J., Gordon, A.N., Fegan, N., 1996. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp gallicida in a large pig herd. *Australian Veterinary Journal* 73, 27-29.
- Carter, G.R., De Alwis, M.C.L. 1989. Haemorrhagic Septicaemia, In: Adlam, C., Rutter, J.M. (Eds.) *Pasteurella* and pasteurellosis. Academic Press, London, 125-137.
- Casas, E., Closa, F., Marco, I., Lavín, S. 2008. El jabalí en zonas urbanas y periurbanas. Problemas que ocasiona y métodos de control (Barcelona, Servicio de Ecopatología de Fauna Salvaje).
- Closa-Sebastiá , F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G., Marco, I., 2011. Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research* 57, 977-981.
- Cloutier, G., D'Allaire, S., Martínez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., Gottschalk, M., 2003. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary Microbiology* 97, 135-151.
- Conklin, R.H., Steele, J.H. 1979. *Erysipelothrix* infections, In: Steele, J.H. (Ed.) CRC Handbook. Series in Zoonoses. CRC press, Boca Raton,, 327-337.
- Crawley, M.J., 2007. The R Book. John Willey and Sons Ltd, Chichester, Uk.
- Csárgola, A., Kecskeméti, S., Kardos, G., Kiss, I., Tuboly, T., 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology* 151, 495-507.
- Cuesta, J.M., Risco, D., Gonçalves, P., García-Jiménez, W.L., Gil, M., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, J., Gómez, L., 2013. Fatal infection due to *Haemophilus parasuis* in a young wild boar (*Sus scrofa*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 297-300.
- Cvetnic, Z., Spicic, S., Tonicic, J., Majnaric, D., Benic, M., Albert, D., Thièbaud, M., Garin-Bastuji, B., 2009. *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *OIE Revue Scientifique et Technique* 28, 1057-1067.

- Chiari, M., Ferrari, N., Zanoni, M., Alborali, L., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae* temporal trends of infection and pathological effects in wild boar populations. *European Journal of Wildlife Research*, *In Press*.
- Cho, W.S., Chae, C., 2003. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization. *Letters in Applied Microbiology* 37, 56-60.
- de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Allepuz, A., Mateu, E., Vidal, D., Ruiz-Fons, F., Martín, M., Gortázar, C., Segalés, J., 2008. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Veterinary Microbiology* 129, 163-170.
- De Jong, M.F. 2006. Progressive and Nonprogressive Atrophic Rhinitis, In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 577-602.
- Deyoe, B.L., 1972. Immunology and public health significance of swine brucellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 160, 640-643.
- Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Herrera-León, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, J.E., Mora, A., Mateo, R., Hanning, I., Vidal, D., 2013. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: Relationship with management practices and livestock influence. *Veterinary Microbiology* 163, 274-281.
- Diedrich, C.R., Flynn, J.L., 2011. HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfection immunology: How does HIV-1 exacerbate tuberculosis? *Infection and Immunity* 79, 1407-1417.
- Elias, D., Akuffo, H., Pawlowski, A., Haile, M., Schön, T., Britton, S., 2005a. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 23, 1326-1334.
- Elias, D., Akuffo, H., Thors, C., Pawlowski, A., Britton, S., 2005b. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 139, 398-404.
- Elias, D., Wolday, D., Akuffo, H., Petros, B., Bronner, U., Britton, S., 2001. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. *Clinical and Experimental Immunology* 123, 219-225.
- Elvy, J., Hanspal, I., Simcock, P., 2008. A case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing bilateral endogenous endophthalmitis. *Journal of Clinical Pathology* 61, 1223-1224.

- Ezenwa, V.O., Etienne, R.S., Luikart, G., Beja-Pereira, A., Jolles, A.E., 2010. Hidden consequences of living in a wormy world: Nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *American Naturalist* 176, 613-624.
- Ezenwa, V.O., Jolles, A.E., 2011. From host immunity to pathogen invasion: The effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integrative and Comparative Biology* 51, 540-551.
- Fernández-Llario, P., 1996. Ecología del jabalí en Donaña: parámetros reproductivos e impacto ambiental. University of Extremadura, Cáceres.
- Fernández-Llario, P., 2005. The sexual function of wallowing in male wild boar (*Sus scrofa*). *Journal of Ethology* 23, 9-14.
- Fernández-Llario, P. 2006. Jabalí (*Sus scrofa*). In Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. , Carrascal, L.M., Salvador, A., eds. (Madrid, Museo de Ciencias Naturales).
- Fernández-Llario, P., Carranza, J., 2000. Reproductive performance of the wild boar in a Mediterranean ecosystem under drought conditions. *Ethology, Ecology y Evolution* 12, 335-343.
- Fernández-Llario, P., Carranza, J., Mateos-Quesada, P., 1999. Sex allocation in a polygynous mammal with large litters: the wild boar. *Animal Behavior Bulletin* 58.
- Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., 1998. Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriologica Sinica* 43.
- Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., 2003. Population structure of the wild boar (*Sus scrofa*) in two Mediterranean habitats in the western Iberian Peninsula. *Folia Zoologica* 52, 143-148.
- Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., 2005a. Influence of rainfall on the breeding biology of wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean ecosystem. *Folia Zoologica Monographs* 54, 240-248.
- Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., 2005b. Udder preference in wild boar piglets. *Acta Ethologica* 8, 51-55.
- Gamito-Santos, J.A., Gómez, L., Calero-Bernal, R., Rol-Díaz, J.A., González-Ruibal, L., Gómez-Blázquez, M., Pérez-Martín, J.E., 2009. Histopathology of trichinellosis in wild boar. *Veterinary Parasitology* 165, 165-169.
- García-Jiménez, W.L., 2013. Tuberculosis bovina en especies silvestres: indicadores histopatológicos y moleculares útiles para el diseño de medidas de control. Universidad de Extremadura, Cáceres.

- García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina, J.M., Fernández-Llario, P., Abecia, J.A., García-Sánchez, A., Martínez, R., Risco, D., Ortiz-Peláez, A., Salguero, F.J., Smith, N.H., Gómez, L., Hermoso de Mendoza, J., 2012a. Comparative Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 102-109.
- García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina, J.M., Martínez, R., Carranza, J., Cerrato, R., García-Sánchez, A., Risco, D., Moreno, J.C., Sequeda, M., Gómez, L., Fernández-Llario, P., Hermoso-de-Mendoza, J., 2012b. Non-tuberculous *Mycobacteria* in Wild Boar (*Sus scrofa*) from Southern Spain: Epidemiological, Clinical and Diagnostic Concerns. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- García-Jiménez, W.L., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J.M., Cerrato, R., Cuesta, J., García-Sánchez, A., Gonçalves, P., Martínez, R., Risco, D., Salguero, F.J., Serrano, E., Gómez, L., Hermoso-de-Mendoza, J., 2013. Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 110, 435-446.
- Garrido, J.L., 2012. La Caza Sector Economico. Valoración por subsectores. FEDENCA-EEC, Madrid.
- Gavier-Widen, D., Chambers, M.A., Palmer, N., Newell, D., Hewinson, R.G., 2001. Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in Eurasian badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Veterinary Record* 148, 299-304.
- Gibbs, E.P., 1997. The public health risks associated with wild and feral swine. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 16, 594-598.
- Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L., Rakich, P.M. 2007. Skin and appendages, In: Maxie, M.G., Jubb, K.V.F. (Eds.) *Jubb, Kenedy and Palmer's Pathology of domestic animals*. Elsevier, Edinburgh, 679-680.
- Godfroid, J., 2002. Brucellosis in wildlife. *OIE Revue Scientifique et Technique* 21, 277-286.
- Godfroid, J., Kahlsbohrer, A., 2002. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology* 90, 135-145.
- Godfroid, J., Michel, P., Uytterhaegen, L., De Smedt, C., Rasseneur, F., Boelaert, F., Saegerman, C., Patigny, X., 1994. Endemic brucellosis due to *Brucella suis* biotype 2 in the wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *Annales de Medecine Veterinaire* 138, 263-268.
- Good, M., Clegg, T.A., Duignan, A., More, S.J., 2011. Impact of the national full herd depopulation policy on the recurrence of bovine tuberculosis in Irish herds, 2003 to 2005. *Veterinary Record* 169, 581.

- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research* 52, 81-87.
- Gortazar, C., Cowan, P., 2013. Introduction to this issue: Dealing with TB in wildlife. *Epidemiology and Infection* 141, 1339-1341.
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J., 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *European Journal of Wildlife Research* 53, 241-256.
- Gortázar, C., Vicente, J., Fierro, Y., León, L., Cubero, M.J., González, M., 2002. Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. *Annals of the New York Academy of Sciences* 969, 210-212.
- Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Gavín, P., Juste, R.A., Martín, C., Acevedo, P., De La Puente, M., Höfle, U., 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research* 36, 43-52.
- Gottschalk, M., Segura, M., 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: The unresolved questions. *Veterinary Microbiology* 76, 259-272.
- Graham, A.L., Cattadori, I.M., Lloyd-Smith, J.O., Ferrari, M.J., Bjornstad, O.N., 2007. Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends in Parasitology* 23, 284-291.
- Gray, S.J., 1984. *Aeromonas hydrophila* in livestock: Incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *Journal of Hygiene* 92, 365-375.
- Groot-Bruinderink, G.W.T.A., Hazebroek, E., van der Voot, H., 1994. Diet and condition of wild boar, *Sus scrofa scrofa*, without supplementary feeding. *Journal of Zoology (London)* 233, 631-648.
- Gummow, B., 2010. Challenges posed by new and re-emerging infectious diseases in livestock production, wildlife and humans. *Livestock Science* 130, 41-46.
- Haenlein, M., Kaplan, A.M., 2004. A beginners's guide to Partial Least Squares analysis. *Understanding Statistics* 3, 283-297.
- Hälli, O., Ala-Kurikka, E., Nokireki, T., Skrzypczak, T., Raunio-Saarnisto, M., Peltoniemi, O.A.T., Heinonen, M., 2012. Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *Veterinary Journal* 194, 98-101.

- Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production* 10, 27-30.
- Hatcher, M.J., Dunn, A.M., 2011. *Parasites in ecological communities, from interactions to ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, 439 p.
- Hensel, A., Ganter, M., Kipper, S., Krehon, S., Wittenbrink, M.M., Petzoldt, K., 1994. Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1697-1702.
- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, M., 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive Veterinary Medicine* 74, 239-247.
- Herrero, J., 2002. Adaptación funcional del jabalí *Sus scrofa* L. a un ecosistema forestal y a un sistema agrario intensivo en Aragón. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares.
- Herrero, J., García-Serrano, A., Couto, S., Ortuño, V.M., García-González, R., 2006. Diet of wild boar *Sus scrofa* L. and crop damage in an intensive agroecosystem. *European Journal of Wildlife Research* 52, 245-250.
- Herrero, J., García-Serrano, A., García-González, R., 1995. Wild boar (*Sus scrofa*) hunting in south-western Pyrenees (Spain): Preliminary data. *Ibex Journal of Mountain Ecology* 3, 228-229.
- Higgins, R., Gottschalk, M. 2006. Streptococcal Diseases, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 769-784.
- Higgins, R., Lagacé, A., Messier, S., Julien, L., 1997. Isolation of *Streptococcus suis* from a young wild boar. *Canadian Veterinary Journal* 38, 114.
- Hotzel, H., Berndt, A., Melzer, F., Sachse, K., 2004. Occurrence of *Chlamydiaceae* spp. in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). *Veterinary Microbiology* 103, 121-126.
- Hur, T., Cheng, K.C., Hsieh, J.M., 1995. *Aeromonas hydrophila* lung abscess in a previously healthy man. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 27, 295.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 35-73.

- Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., Etienne, R.S., Turner, W.C., Olf, H., 2008. Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* 89, 2239-2250.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Kaden, V., Lange, E., Fischer, U., Strebelow, G., 2000. Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: evaluation of the first field study in Germany. *Veterinary Microbiology* 73, 239-252.
- Kalorey, D.R., Yuvaraj, S., Vanjari, S.S., Gunjal, P.S., Dhanawade, N.B., Barbuddhe, S.B., Bhandarkar, A.G., 2008. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31, 459-465.
- Kamal, S.M., El Sayed Khalifa, K., 2006. Immune modulation by helminthic infections: Worms and viral infections. *Parasite Immunology* 28, 483-496.
- Kekarainen, T., Montoya, M., Mateu, E., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *Journal of General Virology* 89, 760-765.
- Kiluge, J.P., Perl, S., 1992. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicaemia-polyserositis and streptococcal encephalitis in a calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 196-197.
- Kim, J., Chae, C., 2004. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *Veterinary Journal* 167, 104-106.
- Laber, K.E., Whary, M.T., Bingel, S.A., Goodrich, J.A., Smith, A.C., Swindle, M.M., James, G.F., Lynn, C.A., Franklin, M.L., Fred, W.Q. 2002. *Biology and Diseases of Swine*, In: *Laboratory Animal Medicine (Second Edition)*. Academic Press, Burlington, 615-673.
- Landolt, G.A., Karasin, A.I., Phillips, L., Olsen, C.W., 2003. Comparison of the Pathogenesis of Two Genetically Different H3N2 Influenza A Viruses in Pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1936-1941.
- Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G., 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology* 6.
- Lello, J., Knopp, S., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Utzinger, J., Viney, M.E., 2013. The relative contribution of co-infection to focal infection risk in children. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 20122813.

- Lepine, P., Atanasiu, P., 1950. Existence in Madagascar of enzootic swine encephalomyelitis; crossed immunity with the Teschen virus; transmission to the wild boar. *Annales de l'Institut Pasteur Immunology* 79, 113-120.
- Leuenberger, R., Boujon, P., Thür, B., Miserez, R., Garin-Bastuji, B., Rüfenacht, J., Stärk, K.D.C., 2007. Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Veterinary Record* 160, 362-368.
- Li, X.X., Zhou, X.N., 2013. Co-infection of tuberculosis and parasitic diseases in humans: A systematic review. *Parasites and Vectors* 6, 79.
- Lipej, Z., Segalés, J., Jemerski, L., Olvera, A., Roic, B., Novosel, D., Mihaljevic, Z., Manojlovic, L., 2007. First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Veterinaria Hungarica* 55, 389-404.
- Lipowski, A., 2003. European wild boar (*Sus scrofa* L.) as a reservoir of infectious diseases for domestic pigs. *Medycyna Weterynaryjna* 59, 861-863.
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology* 128, 217-244.
- Mackie, J.T., Barton, M., Kettlewell, J., 1992. *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. *Australian Veterinary Journal* 69, 227-228.
- MacMillan, A.P., Schleicher, H., Korslund, J., Stoffregen, W. 2006. Brucellosis, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine*. Iowa State Univ. Press, Ames, 603-612.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., De Kruif, A., 2000. Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 31, 313-327.
- Maresch, C., Lange, E., Teifke, J.P., Fuchs, W., Klupp, B., Müller, T., Mettenleiter, T.C., Vahlenkamp, T.W., 2012. Oral immunization of wild boar and domestic pigs with attenuated live vaccine protects against Pseudorabies virus infection. *Veterinary Microbiology* 161, 20-25.
- Martin, C., Pastoret, P.P., Brochier, B., Humblet, M.F., Saegerman, C., 2011. A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe. *Veterinary Research* 42.
- Martínez-Rica, J.P.P.C.P.B.E., 12 : 19-54., 1981. Nuevos datos sobre conducta social del jabalí en condiciones de semilibertad. *Publicaciones Centro Pirenaico de Biología Experimental* 12, 19-54.

- Massey, P.D., Polkinghorne, B.G., Durrheim, D.N., Lower, T., Speare, R., 2011. Blood, guts and knife cuts: Reducing the risk of swine brucellosis in feral pig hunters in north-west New South Wales, Australia. *Rural and Remote Health* 11.
- Meng, X.J., Lindsay, D.S., 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 2697-2707.
- Menin, Ñ., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., Báfica, A., 2013. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. *PLoS ONE* 8, e53884.
- Ministerio de Agricultura, A.y.M.A. 2011. Informe final técnico-financiero programa nacional de la tuberculosis bovina año 2011.
- Ministerio de Agricultura, A.y.M.A. 2012. Estadística Anual de Caza, Alimentación, S.G.d.A.y., ed. (Madrid).
- Moller, A.P., Jennions, M.D., 2002. How much variance can be explained by ecologist and evolutionary biologists? *Oecologia (Berlin)* 132, 492-500.
- Muñoz-Mendoza, M., Marreros, N., Boadella, M., Gortázar, C., Menéndez, S., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Copano, M.F., Amado, J., Sáez, J.L., Mourelo, J., Balseiro, A., 2013. Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: A different picture from Mediterranean habitats. *BMC Veterinary Research* 9.
- Muñoz, P.M., Boadella, M., Arnal, M., de Miguel, M.J., Revilla, M., Martínez, D., Vicente, J., Acevedo, P., Oleaga, A., Ruiz-Fons, F., Marín, C.M., Prieto, J.M., de la Fuente, J., Barral, M., Barberan, M., de Luco, D.F., Blasco, J.M., Gortázar, C., 2010. Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infectious Diseases* 10, 46.
- Navarro-González, N., 2013. Frequency of zoonotic enteric pathogens and antimicrobial resistance in wild boar (*Sus scrofa*) Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and sympatric free-ranging livestock in a natural environment (NE Spain). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Navarro-Gonzalez, N., Casas-Díaz, E., Porrero, C.M., Mateos, A., Domínguez, L., Lavín, S., Serrano, E., 2013. Food-borne zoonotic pathogens and antimicrobial resistance of indicator bacteria in urban wild boars in Barcelona, Spain. *Veterinary Microbiology*.
- Navarro-González, N., Porrero, M.C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Domínguez, L., Lavín, S., 2013. Antimicrobial resistance in indicator *Escherichia coli* isolates from free-ranging livestock and sympatric wild ungulates in a natural environment (Northeastern Spain). *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6184-6186.

- Nkuo-Akenji, T.K., 2006. Malaria and helminth co-infection in children living in a malaria endemic setting of mount Cameroon and predictors of anemia. *Journal of Parasitology* 96, 1191-1195.
- Oliveira, S., Galina, L., Pijoan, C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 495-501.
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal health research reviews* 12, 133-148.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology* 41, 624-640.
- Paik, J.Y., Choi, J.H., Kim, M.K., Choi, E.H., Lee, H.J., Park, K.U., 2011. A Case of Disseminated *Mycobacterium bovis* Infection after BCG Vaccination (Tokyo strain) in an Apparently Immunocompetent Infant. *Korean Journal of Pediatric Infectious Diseases* 18, 91-96.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso De Mendoza, M., Hermoso De Mendoza, J., 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology* 97, 123-133.
- Pathak, A.K., Pelensky, C., Boag, B., Cattadori, I.M., 2012. Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infections: Observations from the field and evidence from the laboratory. *International Journal for Parasitology* 42, 647-655.
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M.E., Källenius, G., 2012. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002464.
- Pejsak, Z.K., Truszczyński, M.J. 2006. Aujeszky's Disease, In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 419-435.
- Pérez, J.M., Meneguz, P.G., Dematteis, A., Rossi, L., Serrano, E., 2006. Parasites and conservation biology: The 'ibex-ecosystem'. *Biodiversity and Conservation* 15, 2033-2047.

- Pijoan, C. 2006. Pneumonic Pasteurellosis, In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 719-726.
- Polkinghorne, A., Borel, N., Becker, A., Lu, Z.H., Zimmermann, D.R., Brugnera, E., Pospischil, A., Vaughan, L., 2009. Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Veterinary Microbiology* 135, 142-146.
- Puigdefábregas-Tomás, J., 1981. Observaciones sobre la hozadura del jabalí en ambiente forestal. *Publicaciones Centro Pirenaico Biología Experimental* 12, 7-16.
- Ranjan, R., Panda, S.K., Acharya, A.P., Singh, A.P., Gupta, M.K., 2011. Molecular diagnosis of haemorrhagic septicaemia - A review. *Veterinary World* 4, 189-192.
- Register, K.B., Brockmeier, S.L., de Jong, M.F., Pijoan, C. 2012. Pasteurellosis, In: Zimmermann, J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.) Diseases of Swine. Wiley & Sons, Inc., 798-810.
- Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., Willems, H., 2009. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology* 136, 250-258.
- Reuter, G., Nemes, C., Boros, Á., Kapusinszky, B., Delwart, E., Pankovics, P., 2012. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Archives of Virology* 157, 1143-1147.
- Risco, D., Fernández-Llario, P., García-Jimenez, W.L., Gonçalves, P., Cuesta, J.M., Martínez, R., Sanz, C., Sequeda, M., Gómez, L., Carranza, J., de Mendoza, J.H., 2013a. Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations. *Transboundary and Emerging Diseases* 60 Suppl 1, 121-127.
- Risco, D., García, A., Fernández-Llario, P., García, W.L., Benítez, J.M., Gonçalves, P., Cuesta, J.M., Gómez, L., Rey, J., De Mendoza, J.H., 2013b. Ocular lesions associated with *Chlamydia suis* in a wild boar piglet (*Sus Scrofa*) from a semi-free range population in Spain. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44, 159-162.
- Risco, D., Llario, P.F., Velarde, R., García, W.L., Benítez, J.M., García, A., Bermejo, F., Cortés, M., Rey, J., De Mendoza, J.H., Gómez, L., 2011. Outbreak of Swine Erysipelas in a Semi-Intensive Wild Boar Farm in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 445-450.
- Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J.T., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Vicente, J., 2012. A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in

- domestic and wild ungulates in South Central Spain. BMC Veterinary Research 8.
- Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A.I., Barasona, J.A., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Vicente, J., 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain. European Journal of Wildlife Research, 1-9.
- Rogers, D.G., Andersen, A.A., 1999. Conjunctivitis caused by a swine *Chlamydia trachomatis*-like organism in gnotobiotic pigs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 11, 341-344.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., Lopez-Goni, I., 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology 33, 615-617.
- Rosell, C., 1998. Biología i ecologia del senglar (*Sus scrofa* L., 1758) a dues poblacions del nord-est ibèric. Aplicació a la gestió. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Rosell, C., Fernández-Llario, P., Herrero, J., 2001. El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). Galemys 13, 1-25.
- Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Höfle, U., Villanúa, D., Gauss, C., Segalés, J., Almería, S., Montoro, V., Gortázar, C., 2006. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. Theriogenology 65, 731-743.
- Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Höfle, U., Vicente, J., Gortázar, C., 2007. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. Veterinary Microbiology 120, 241-250.
- Sáenz de Buruaga, M., 1995. Alimentación del jabalí (*Sus scrofa castilianus*) en el norte de España. Ecología (Madrid) 9, 367-386.
- Sáez-Royuela, C., 1989. Biología y ecología del jabalí (*Sus scrofa*). INIA. Colección Tesis Doctorales 78.
- Sáez-Royuela, C., Tellería, J.L., 1987. Reproductive trends of the wild boar (*Sus scrofa*) in Spain. Folia Zoologica Monographs 36, 21-25.
- Salgame, P., 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. Current Opinion in Immunology 17, 374-380.
- Salinas, J., Caro, M.R., Vicente, J., Cuello, F., Reyes-García, A.R., Buendía, A.J., Rodolakis, A., Gortázar, C., 2009. High prevalence of antibodies against *Chlamydiaceae* and *Chlamydophila abortus* in wild ungulates using two "in house" blocking-ELISA tests. Veterinary Microbiology 135, 46-53.

- Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J.F., Mentaberre, G., Briones, V., Lavín, S., Domínguez, L., Gottschalk, M., Vela, A.I., 2014. Characterisation of *Streptococcus suis* isolates from wild boars (*Sus scrofa*). The Veterinary Journal, *In Press*.
- Santos, N., Geraldes, M., Afonso, A., Almeida, V., Correia-Neves, M., 2010. Diagnosis of Tuberculosis in the Wild Boar (*Sus scrofa*): A comparison of Methods Applicable to Hunter-Harvested Animals. PLoS ONE 5, e12663.
- Santos, P., Fernández-Llario, P., Fonseca, C., Monzón, A., Bento, P., Soares, A.M.V.M., Mateos-Quesada, P., Petrucci-Fonseca, F., 2006. Habitat and reproductive phenology of wild boar (*Sus scrofa*) in the western Iberian Peninsula European Journal of Wildlife Research 52, 207-212.
- Schiller, I., RayWaters, W., Vordermeier, H.M., Jemmi, T., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Gormley, E., Boschioli, M.L., Moyon, J.L., Vela, C., Cagiola, M., Buddle, B.M., Palmer, M., Thacker, T., Oesch, B., 2011. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. Veterinary Microbiology 151, 153-159.
- Seahorn, T.L., Brumbaugh, G.W., Carter, G.K., Wood, R.L., 1989. *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia in a horse. The Cornell veterinarian 79, 151-156.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. 2006. Porcine Circovirus Diseases, In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 299-309.
- Seol, B., Naglic, T., Vrbanac, I., 1998. Isolation of *Streptococcus suis* capsular type 3 from a young wild boar (*Sus scrofa*). Veterinary Record 143, 664.
- Serrano, E., López-Soria, S., Trinchera, L., Segalés, J., 2014. The use of null models and partial least squares approach path modelling (PLS-PM) for investigating risk factors influencing post-weaning mortality in indoor pig farms. Epidemiology and Infection 142, 530-539.
- Sibila, M., Mentaberre, G., Boadella, M., Huerta, E., Casas-Díaz, E., Vicente, J., Gortázar, C., Marco, I., Lavín, S., Segalés, J., 2010. Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. Veterinary Microbiology 144, 214-218.
- Silva, L.M.G., Baums, C.G., Rehm, T., Wisselink, H.J., Goethe, R., Valentín-Weigand, P., 2006. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. Veterinary Microbiology 115, 117-127.
- Simintzis, G., 1964. *Salmonella* of wild boars (*Sus scrofa*). Bulletin de l'Academie Veterinaire de France 37, 503-506.

- Sjarmidi, A., Gerard, J.F., 1988. Autour de la systématique et la distribution des suidés. Italian Journal of Zoology (Modena) 22, 415-448.
- Soike, D., Schulze, C., Kutzer, P., Ewert, B., van der Grinten, E., Schliephake, A., Ewers, C., Bethe, A., Raus, J., 2012. Akute Pasteurellose bei Damwild, Rindern und Schweinen in einer Region im Osten Deutschlands Berl Munch Tierarztl Wochenschr 125, 122-128.
- Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O., Chengappa, M.M., 1997. *Streptococcus suis*: Past and present. Veterinary Research Communications 21, 381-407.
- Steinmann, P., Utzinger, J., Du, Z.W., Zhou, X.N. 2010. Multiparasitism. A Neglected Reality on Global, Regional and Local Scale. In Advances in Parasitology, 21-50.
- Supali, T., Verweij, J.J., Wiria, A.E., Djuardi, Y., Hamid, F., Kaisar, M.M.M., Wammes, L.J., Lieshout, L.V., Luty, A.J.F., Sartono, E., Yazdanbakhsh, M., 2010. Polyparasitism and its impact on the immune system. International Journal for Parasitology 40, 1171-1176.
- Teankum, K., Pospischil, A., Janett, F., Bürgi, E., Brugnera, E., Hoelzle, K., Polkinghorne, A., Weilenmann, R., Zimmermann, D.R., Borel, N., 2006. Detection of *chlamydiae* in boar semen and genital tracts. Veterinary Microbiology 116, 149-157.
- Thacker, E.L., 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 17, 551-565.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. Journal of Clinical Microbiology 39, 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J.S., 1998a. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. Journal of Clinical Microbiology 36, 1096-1100.
- Townsend, K.M., O'Boyle, D., Thi Phan, T., Xuan Hanh, T., Wijewardana, T.G., Wilkie, I., Tien Trung, N., Frost, A.J., 1998b. Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. Veterinary Microbiology 63, 205-215.
- Valet, G., Rosell, C., Chayron, L., Fosty, P., Spitz, F., 1994. Regime alimentaire automnal du sanglier (*Sus scrofa*) en Ariège, France, et en Catalogne, Espagne. Gibier Faune Sauvage 11, 313-326.
- Van Campen, H., Rhyan, J., 2010. The Role of Wildlife in Diseases of Cattle. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice 26, 147-161.
- Venteo, A., Rebollo, B., Sarraseca, J., Rodríguez, M.J., Sanz, A., 2012. A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid

- protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of Virological Methods* 181, 109-113.
- Vera, J.H., Hill, S.C., Rubinstein, L., 2012. Bacille Calmette-Guerin disease following Bacille Calmette- Guerin vaccination of an HIV-infected health-care worker *International Journal of STD and AIDS* 23, 1-2.
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.
- Vicente, J., León-Vizcaino, L., Gortázar, C., Cubero, M.J., González, M., Martín-Atance, P., 2002. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 38, 649-652.
- Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., Gortázar, C., 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV 2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research* 35, 243-253.
- Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., König, M., Stolle, A., Stephan, R., 2010. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 307-312.
- Wacheck, S.F.-A., M; Koenig, M; Stolle, A; Stephan, R, 2010. Wild boars as an important reservoir for food-borne pathogens. *Foodborne pathogens and diseases* 7, 307-312.
- Wang, Q., Chang, B.J., Riley, T.V., 2010. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology* 140, 405-417.
- Watanabe, T.T.N., de Almeida, L.L., Wouters, F., Wouters, A.T.B., Zlotowski, P., Driemeier, D., 2012. Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza a infection in Brazil, 2009-2010. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32, 1148-1154.
- Wattrang, E., McNeilly, F., Allan, G.M., Greko, C., Fossum, C., Wallgren, P., 2002. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Veterinary Microbiology* 86, 281-293.
- Weary, D., Braithwaite, L.A., Fraser, D., 1998. Vocal response to pain in piglets. *Applied Animal Behaviour Science* 56, 161-172.
- Weary, D., Fraser, D., 1995. Calling by domestic piglets: reliable signals of need? *Animal Behavior Bulletin* 50, 1047-1055.
- Wegener, H.C., 1992. *Staphylococcus hyicus* Epidemiology and Virulence in Relation to Exudative Epidermitis in Pigs. Royal Veterinary Agricultural University, Copenhagen.

- Wegener, H.C., Skov-Jensen, E.W. 2006. Exudative Epidermitis, In: Straw, B., Zimmermann, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 675-679.
- Whitaker, H.K., Neu, S.M., Pace, L.W., 1990. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2, 244-246.
- Wood, R.L. 1975. *Erysipelothrix* infection, In: Hubbert, W.T., McCulloch, W.F., Scurrenberger, P.R. (Eds.) Diseases transmitted from animals to man. Charles C. Thomas Limited, Springfield, 271-281.
- Wood, R.L., Henderson, L.M. 2006. Erysipelas, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Diseases of swine. Iowa State Univ. Press, Ames, 629-639.
- Wu, N., Abril, C., Hinic, V., Brodard, I., Thür, B., Fattebert, J., Hüsey, D., Ryser-Degiorgis, M.P., 2011. Free-ranging wild boar: A disease threat to domestic pigs in Switzerland? Journal of Wildlife Diseases 47, 868-879.
- Xia, C., Ma, Z.H., Rahman, M.H., Wu, Z.G., 2004. PCR cloning and identification of the B-haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. Aquaculture 229, 45-53.
- Yacob, H.T., Terefe, G., Jacquiet, P., Hoste, H., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., 2006. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: Effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. Veterinary Parasitology 137, 184-188.
- Yamamoto, K., Kijima, M., Takahashi, T., Yoshimura, H., Tani, O., Kojyou, T., Yamawaki, Y., Tanimoto, T., 1999. Serovar, pathogenicity and antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from farmed wild boars (*Sus scrofa*) affected with septicemic erysipelas in Japan. Research in Veterinary Science 67, 301-303.
- Yang, D.K., Kim, H.H., Hyun, B.H., Lim, S.I., Nam, Y.K., Nah, J.J., Song, J.Y., 2013. Detection of neutralizing antibody against Japanese encephalitis virus in wild boars of Korea. Journal of Bacteriology and Virology 42, 353-356.

