

TITULO: Estudio preliminar de factores genéticos y ambientales predisponentes a la tuberculosis en la raza bovina Cárdena Andaluza

Antonio Molina¹, Gabriel Anaya², Nora Laseca², José M. Pastor³, Alfonso Luque⁴

¹ Catedrático de Genética de la Fac. Veterinaria de Córdoba. Responsable del Programa de Conservación de la raza Cárdena Andaluza.

² Investigador del grupo Meragem. Universidad de Córdoba

³ Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo sostenible. Junta de Andalucía

⁴ Secretario Ejecutivo de la raza Cárdena Andaluza

INTRODUCCION

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad crónica provocada por bacilos del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), bacteria de la familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*, integrado, entre otros, por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium africanum*.

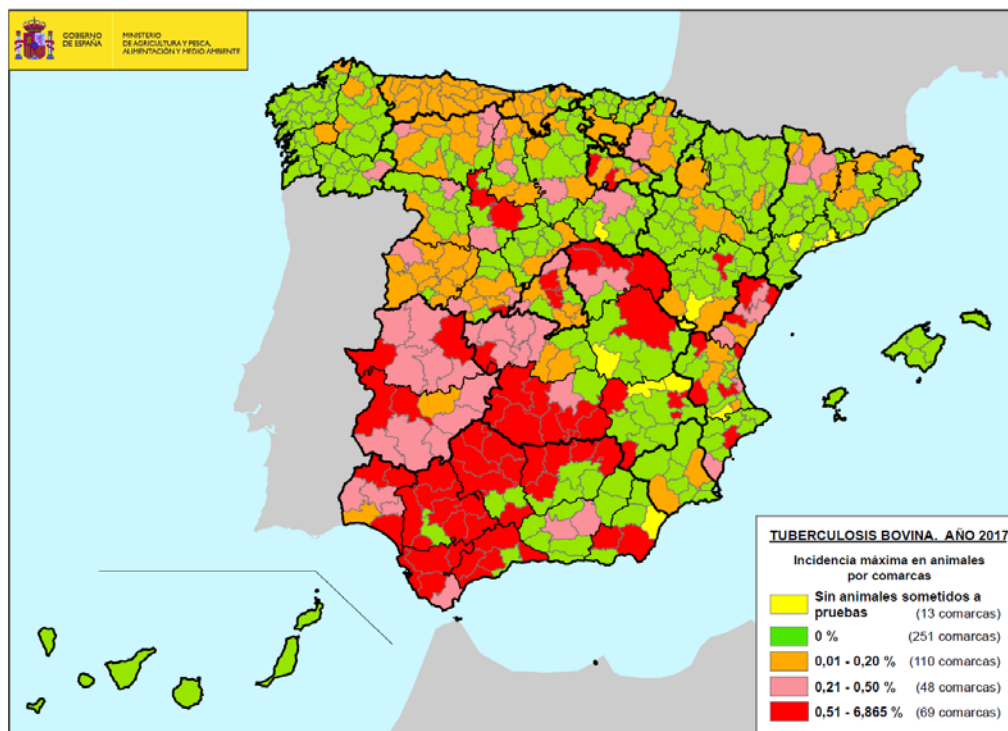
La vía de infección habitual es la inhalación de las gotículas infectadas que un animal enfermo ha expulsado al toser. Aun así también pueden contagiarse al ingerir leche cruda procedente de vacas enfermas. Dado que la enfermedad es de evolución lenta y pueden pasar meses o incluso años hasta que el animal infectado muere, un solo ejemplar puede transmitir la enfermedad a muchos otros componentes del rebaño antes de manifestar los primeros signos clínicos. De ahí que las principales vías de diseminación sean el desplazamiento de animales domésticos infectados asintomáticos y el contacto con animales salvajes infectados. No obstante, *M. bovis*, se ha identificado en innumerables especies de animales domésticos como ovejas, cabras, caballos, cerdos o perros entre otros y salvajes bisontes, búfalos, jabalíes, zorros, etc... Esta capacidad patógena, junto con la gran variedad de fauna que actúa de reservorio, hace extremadamente difícil erradicar la enfermedad en las explotaciones de vacuno en extensivo (la gran mayoría) constituyéndose como una de las zoonosis más importantes. Tanto es así que en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) se considera una infección de notificación obligatoria a la OIE (conforme al Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE). En países desarrollados, la TB humana que se atribuye al contacto con ganado infectado es inferior al 1% de los casos confirmados debido principalmente al tratamiento térmico de la leche, control sanitario en ganadería y la vigilancia en matadero. Sin embargo son prácticas no habituales en países en desarrollo donde la TB humana es endémica y el 20% de casos proviene del contacto directo con animales infectados. No obstante la globalización, el gran movimiento de migrantes que llegan a los países desarrollados como España hacen que haya en la última década un incremento claro de la casuística en nuestro país.

En los últimos años, las comunidades de Extremadura, Andalucía y la mitad occidental de Castilla la Mancha se han mantenido como las regiones con mayor prevalencia en rebaños de la enfermedad, destacando algunas comarcas en las que hasta el 71% de los rebaños ha generado algún positivo (Figura 1). Según datos del MAPAMA, en el primer trimestre de 2018 se dieron 5455 casos positivos de tuberculosis bovina en vacuno en España. El 50% de los casos positivos (2756) ocurrieron en Andalucía.

En el caso del vacuno bovino Cárdeno Andaluz, el 58% de las explotaciones ha tenido positivos en 2016 o 2017, con una prevalencia que ha oscilado entre el 2,3% al 67% (promedio del 6,4%). Afortunadamente la situación actual es mucho más positiva, ya que solamente dos explotaciones presenta la calificación T2, siendo el resto T3 (máxima calificación).

Los datos de prevalencia son los siguientes Ganadería 1: 2 positivos de 7 analizados; Ganadería 2: 5/129; Ganadería 3: 10 de 15; Ganadería 4: 8/165; Ganadería 5: 0 de 80; Ganadería 6: 8 de 71 y Ganadería 7: 13 de 220. La prevalencia ha variado entre un 2% (menor prevalencia) y un 66% (mayor prevalencia). Curiosamente las mayores incidencias 28% y 66% se han dado en explotaciones en las que se han analizado pocos animales 7 y 15 respectivamente, a diferencia de las de menor prevalencia 2%, 4% y 5% con 129, 165 y 220 animales analizados.

Figura 1. Prevalencia de la tuberculosis en España (año 2017, fuente Ministerio de Agricultura)



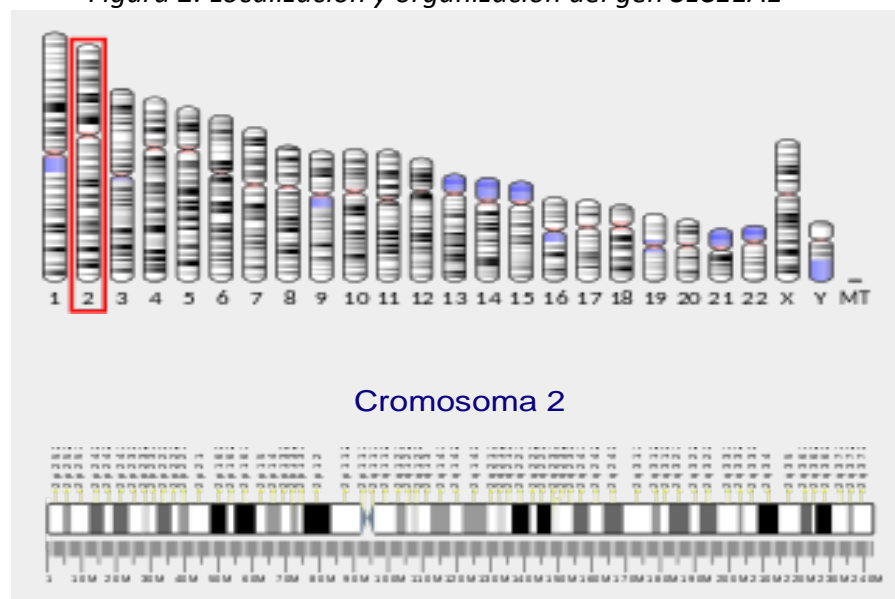
El método de diagnóstico de la enfermedad más utilizado es la prueba de la tuberculina, que consiste en medir la reacción inmunitaria tras la inyección intradérmica de una pequeña cantidad de antígeno, estimándose en un 99% de especificidad. Sin embargo, el diagnóstico definitivo precisa del cultivo de bacterias para su crecimiento en laboratorio. También se utiliza como

prueba complementaria oficial en rebaños positivos considerados infectados y en aquellos que la autoridad competente lo considere por estar relacionados epidemiológicamente, un nuevo método de diagnóstico mediante detección de anticuerpos denominado γ -Interferón, con una especificidad estimada del 97%.

Se ha visto como la enfermedad y los síntomas varían enormemente entre individuos, debido a las diferencias genéticas que afectan al sistema inmune de cada uno de ellos. Aunque se han estudiado numerosos genes, se ha observado que el *gen de la activación del macrófago* (NRAMP1 o SLC11A1) tiene un papel fundamental en la inmunidad innata. Este es un gen miembro de la familia de portadores de solutos 11 (transportadores de iones metálicos divalentes acoplados a protones) que codifica una proteína de membrana de paso múltiple. La proteína funciona como un transportador de moléculas de metal de transición divalente (hierro y manganeso) involucrado en el metabolismo del hierro y la resistencia del huésped a ciertos patógenos. Se ha visto que tiene un efecto pleiotrópico sobre la activación del macrófago, a través de la regulación de la quimioquina KC, interleuquina -1β (IL- 1β), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), liberación del óxido nítrico (NO), flujo de L-arginina, estallido oxidativo y tumoricida así como la actividad antimicrobiana (ver revisión de Blackwell y Searle, 1999; Blackwell y cols., 2000), habiéndose asociado con la mayor o menor propensión a múltiples gérmenes en diferentes especies (ver revisión de Blackwell y cols. 2001) como *Leishmania donovani*, *Salmonella typhimurium*, o *Mycobacterium bovis*.

Las mutaciones en este gen se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas humanas como la tuberculosis y la lepra, y enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (Searle y Blackwell, 1999; Li y cols., 2011). En la especie humana se ha mapeado en el cromosoma 2 (Figura 2).

Figura 2. Localización y organización del gen SLC11A1



Recientemente también ha sido asociada con una mayor o menor susceptibilidad a la TB en poblaciones de Holstein (Cheng y cols., 2015; Liu y cols., 2017). En este trabajo se realiza un primer análisis para comprobar si esta asociación se da también en el bovino de aptitud cárnica, utilizando como raza de referencia la raza Cárdena.

MATERIALES Y METODOS

Análisis Censal

A partir de los datos oficiales de la raza se estimó el tamaño efectivo, y el incremento de consanguinidad prevista de la población global, teniendo en cuenta, además, los condicionantes sanitarios (de forma global y para el caso concreto de la tuberculosis) para ver cómo afectan a dichos parámetros genéticos. Estos condicionantes en el caso de la calificación sanitaria para la tuberculosis son:

- ✓ T3: sin restricciones a movimiento
- ✓ T2-: Solo pueden vender a cebaderos no calificados y matadero, pero no tienen restricciones para entrar animales procedentes de explotaciones calificadas.
- ✓ T2+: En este caso solamente pueden vender a matadero, aunque actualmente se permite enviar animales a cebaderos no calificados del denominado "Proyecto Piloto" y no pueden entrar animales de ninguna explotación.

Análisis genético molecular

Se han analizado 139 muestras de sangre de bovino de 10 ganaderías diferentes (42 de raza Cárdena pertenecientes a 5 ganaderías). Se escogieron animales positivos y negativos al test de la tuberculina en cada una de las explotaciones durante el mismo periodo. Se analizaron 3 SNPs del gen SLC11A1 (SLC11A1-SNP3, SLC11A1-SNP5 y SLC11A1-SNP6) mediante PCR convencional, genotipándose mediante enzimas de restricción Maell y PstI. Los resultados se revelaron en gel de agarosa al 2%. En la figura 3 y 4 se presenta el patrón de bandas de algunos animales, mostrando el genotipo para cada SNP asociados a una mayor o menor resistencia.

Figura 3. Patrón de bandas detectadas en el SNP 5.

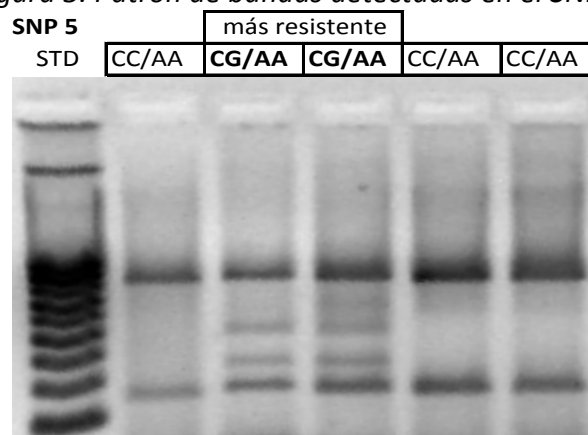
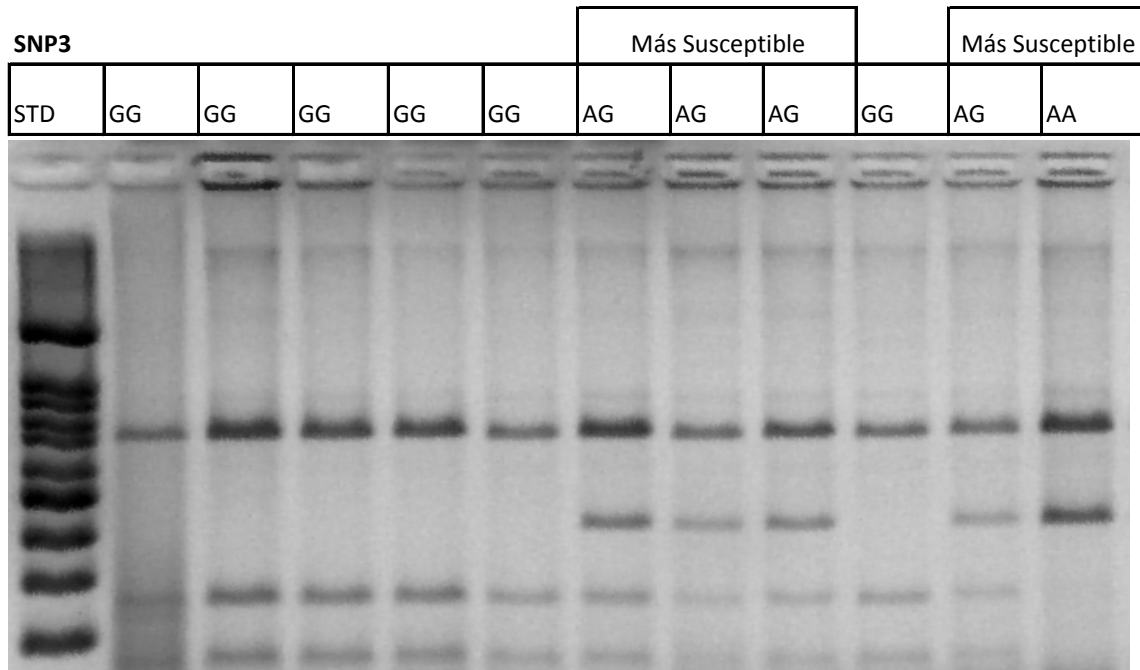


Figura 4. Patrón de bandas detectadas en el SNP 3.



Diagnóstico diferencial

En todos aquellos casos en que fue posible se recopiló información del resultado de diferentes tipos de pruebas diagnósticas de la tuberculosis:

- Reacción cutánea a la tuberculina (RT). 143 animales analizados (132 hembras y 11 machos).
- Cuantificación del Gamma Interferón (GI): 17 animales analizados (todas hembras).
- Cultivo del *micobacterium* (CM): 18 animales analizados (17 hembras, 1 macho).

El diagnóstico por presencia de lesiones macro en la canal no fue considerado dado que de forma rutinaria los mataderos decomisan hígados y pulmones de los animales sacrificados en el saneamiento sin constatar si existe o no lesiones visibles.

Análisis de los principales factores ambientales predisponentes.

Como aproximación a un análisis específico de los factores no genéticos que puedan incrementar o reducir la incidencia de la enfermedad en cada explotación se elaboró una encuesta en la que el responsable de la explotación (12 fincas diferentes) respondía a 63 cuestiones relacionadas con el grado de cumplimiento de las medidas de la Administración para la lucha contra esta enfermedad, sobre las pruebas diagnósticas realizadas en la explotación en

los dos últimos años, medidas de bioseguridad aplicadas, o cohabitación con animales salvajes o especies cinegéticas reintroducidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La raza Cárdena Andaluza es una de las razas de protección especial debido al declive censal ocurrido en las últimas décadas, que están reconocidas en el Catálogo de Razas Españolas por el Ministerio de Agricultura. La falta de unos niveles productivos frente a otras razas mejoradas en un mercado que premia principalmente crecimiento magro y compacidad de las canales, junto con otros aspectos como el abandono de muchas zonas de pastos de montaña donde se criaba de forma tradicional, o la competencia por los pastizales con las especies cinegéticas han hecho que en los últimos años se haya acentuado su declive. La disminución en el número de reproductores y de ganaderos que trabajen de forma entusiasta por el mantenimiento de la raza permite el inicio de una cascada de hechos que es muy difícil de invertir y que hace que sea cada vez más complicado evitar el grave deterioro de la situación. Así, la dispersión geográfica de los pocos ganaderos existentes, junto con la utilización de la mayoría de las reproductoras para el cruce industrial, y las dificultades para conseguir reposición (principalmente de machos) determina un incremento peligroso del nivel de parentesco entre los reproductores, y de la consanguinidad de las crías que determina. A este hecho hay que sumar la aplicación de una normativa de la calificación sanitaria para las enfermedades de declaración obligatoria que impide el movimiento pecuario (intercambio de reproductores pe.) en aquellas en las que han aparecido casos positivos en los últimos dos años.

Dentro de estas enfermedades destaca la tuberculosis por su casuística y por la dificultad para resolver la situación en aquellas explotaciones que comparten pastos con especies cinegéticas y salvajes que actúan como reservorios. Una enfermedad en la que además se da la circunstancia que el diagnóstico no está exento de aparentes contradicciones en algunas ocasiones.

Análisis Censal

En la tabla nº 1 se presenta la evolución del número de reproductores globales de la raza Cárdena Andaluza a lo largo de las últimas décadas (Datos de la Asociación de Criadores y recopilados por Pastor, 2010).

Se puede observar que la situación actual, sin ser tan dramática como la existente en la década de los 90 del pasado siglo, es mucho peor que la de principios de este siglo. Con un número efectivo de 35,5, el incremento esperado de consanguinidad por generación es de 0,014, superior al 1% máximo recomendado por la FAO para este tipo de poblaciones. Hay que tener en cuenta que este incremento es teórico y el esperado en una población ideal (muy apartada de la real) en la que todos los reproductores tienen la misma oportunidad de procrear, una misma

fertilidad y una misma supervivencia... algo muy alejado de la realidad. Si tenemos en cuenta que de estas reproductoras más del 78% son dedicadas hoy día al cruce industrial, y que determinadas ganadería por el hecho de no estar calificadas como T3 no pueden introducir reproductores ni intercambiar con otros ganaderos de la raza, se concluirá que la situación real es mucho más preocupante.

Tabla 1. Efectivos de la raza Cárdena Andaluza en las últimas décadas.

Año (Fuente)	Vacas	Sementales	Ne	ΔF_1(p.u)
1994 (LRAPE)	11	1	3,7	0,136
2008 (Datos de FAGA, SIGGAN y Asociación)	964	23	89,86	0,0056
2018 (Datos Asociación)	624	9	35,5	0,014

LRAPE: Rodero, y cols. 1994.

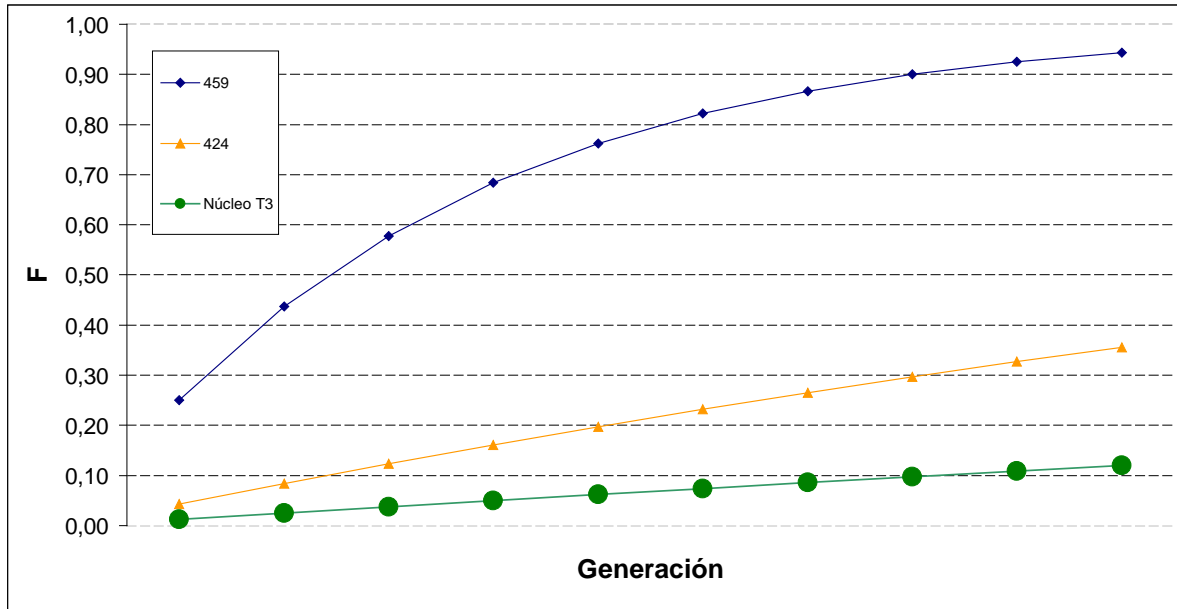
En la tabla 2 se presenta la situación teniendo en cuenta solamente el censo y la posibilidad o no de introducir reproductores por la calificación sanitaria. Se puede observar la existencia de tres explotaciones donde la calificación para la tuberculosis (T2) está creando una situación de extrema gravedad, que de no resolverse a corto plazo llevará a unos niveles de endogamia insoportables, si nos atenemos a los niveles a partir de los cuales se considera que aparecen los síntomas de la depresión consanguínea (a partir del 12%).

Tabla 2. Censos, número efectivo e incremento de consanguinidad prevista teniendo en cuenta la calificación sanitaria

REGA	H Reprod	Sementales	H recrío	M recrío	Calificación	Ne	ΔF	ΔF_5
459	1	1	0	0	T2-B4	2,0	0,25	0,76
424	92	3	22	5	T2B4	11,6	0,04	0,20
322	4	1	1	1	T3B4	39,4	0,01	0,06
451	180	4	13	4	T3B4			
214	71	0	0	0	T3B4			
213	118	0	29	0	T3B4			
921	50	0	0	0	T3B4			
145	112	0	32	0	T3B4			
303	0	0	1	0	T3B4			
144	43	0	22	0	T3B4			
260	11	0	0	0	T3B4			
728	2	1	1	0	T3B4			
109	7	2	0	1	T3B4			
416	30	2	42	6	T3B4			
	628	10						

En la figura 5 se representa la evolución (en el mejor de los casos) prevista para el núcleo calificado sanitariamente de las tres ganaderías calificada T2 en las próximas generaciones.

Figura 5. Evolución prevista en la población y subpoblaciones de Cárdena Andaluza en función del Ne teniendo en cuenta los condicionantes sanitarios



Se puede observar como en la explotación 459 los niveles de endogamia que se alcanzarán si no se establecen medidas correctoras concretas, son rápidamente inviables, mientras que en la 424 se obtendrán dichos niveles a medio plazo. En el caso del núcleo de ganaderías calificadas este incremento a corto plazo es tolerable. No obstante hay que recordar que estos niveles serían los que se obtendrían en la situación ideal en el que hubiese un intercambio regular entre dichas explotaciones, algo que en condiciones de campo no es tan sencillo.

Para terminar este apartado cabe recordar cuales son las manifestaciones de la depresión consanguínea cuando se alcanzan niveles altos de consanguinidad (parentesco elevado) en la explotación: baja fertilidad, abortos, menor supervivencia de las crías, nacimientos con animales con malformaciones, o poca vitalidad... así como una menor resistencia a las enfermedades (INCLUIDA LA TUBERCULOSIS), un menor crecimiento, peor conformación etc... es decir unos niveles muy altos de consanguinidad van a determinar animales menos competitivos y una menor posibilidad de obtener recría agravándose aún más el problema de niveles altos de consanguinidad.

Todo ello hace que sea esencial el incrementar el tamaño efectivo de las explotaciones:

- Incrementando al máximo el número de hembras dedicadas a la cría en pureza
- determinando en aquellas con problemas de endogamia los apareamientos más adecuados (menor parentesco)

- favoreciendo el intercambio de reproductores entre las ganaderías menos emparentadas entre sí
- favoreciendo la utilización de semen (para lo cual hay que incrementar el número de donantes y seleccionarlos con criterios técnicos en base a su variabilidad y parentesco medio con las reproductoras de la población)
- eliminando las causas que impiden el intercambio (saneamiento para conseguir la máxima calificación sanitaria)

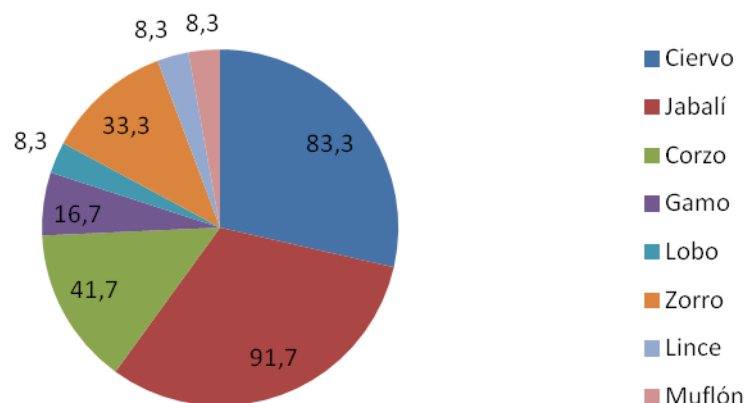
Dentro de este último punto es donde se encaja el trabajo realizado en este convenio. Por un lado se van a analizar algunos aspectos relacionados con los factores predisponentes de la propia explotación y por otro ver si hay marcadores moleculares asociados a una mayor o menor sensibilidad a la enfermedad que puedan ayudarnos a hacer nuestra cabaña más resistente.

Análisis de los principales factores ambientales predisponentes.

Entre los factores predisponentes detectados en la población de bovino Cárdeno Andaluz, destaca el hecho de que en el 100% de las 12 explotaciones de bovino Cárdeno, los animales están en contacto con animales salvajes, de estos en el 92% de las explotaciones los animales salvajes pueden acceder a comederos y/o bebederos del ganado, y sólo el 25% de las explotaciones tiene vallados de exclusión o comederos y bebederos exclusivos para bovino. Por otra parte el 41% de explotaciones son además coto de caza, por lo que el contacto entre las vacas y los reservorios salvajes es más o menos continuo, y lo que es más grave el 91,7% de las explotaciones no practica ninguna medida de control sobre posibles reservorios silvestres.

En la figura 6 se puede observar la variedad de especies salvajes que pueden actuar como reservorios para el bacilo de la tuberculosis bovina.

Figura 6. Porcentaje de explotaciones con presencia de reservorios salvajes.



En las explotaciones que son coto, un 66% no agotan el cupo de caza de ciervo y jabalí. En cualquier caso en todas ellas se considera que es un cupo insuficiente. En una de ellas no se realiza la eliminación higiénica de todos los animales puesto que algunas piezas abatidas no se

recuperan. Asimismo en el 66% de las explotaciones se realizan eliminación higiénica de cadáveres fuera de monterías como práctica habitual para que los jabalíes no actúen de carroñeros.

En este mismo sentido, un 28,6 % de las explotaciones conviven las vacas con otras especies como equinos (21,4%), ovinos (14,3%), y porcino (7,1%), todas ellas posibles portadores de las micobacterias. En el caso del ovino y del porcino, aunque pueden presentar también la tuberculosis, no es de declaración obligatoria ni está sujeta a campañas oficiales de saneamiento, aunque la especie que causa la enfermedad en este caso es diferente, no se puede descartar que actúen como portadores asintomáticos para el M. Bovis.

Otro factor que podría mejorarse sería el hecho de establecer medidas profilácticas, una vez detectados casos (un 20% de las explotaciones no adopta ningún tipo de medidas, con la excepción del aislamiento de los animales positivos del resto antes del sacrificio).

Por otra parte aunque todas las explotaciones toman medidas generales de bioseguridad, únicamente un 25% de las mismas poseen un programa sanitario que incluye enfermedades con efecto inmunodepresor (IBR, BVD y parásitos pulmonares). Por otro lado, en el 25% de las explotaciones hay épocas del año en las que los animales están malnutridos y sólo un 33% de las explotaciones suplementan con sales o vitaminas en épocas de escasez.

Otras medidas que podrían estar contribuyendo negativamente a la eliminación de esta enfermedad es el compartimiento de pastos con animales de otras explotaciones (16,67% de las ganaderías), la falta de limpieza regular de los bebederos (en el 50% de las explotaciones), la falta de métodos de higienización del agua (solamente se realiza en un 12%) o la posibilidad de que los animales beban en charcas sin cercar (el 11,97% de las explotaciones).

En el sentido contrario destaca que en el 100% de explotaciones tienen un programa sanitario y se hacen las pruebas diagnósticas oficiales, y que aunque un 58% de las explotaciones tuvieron algún positivo en la campaña 2016-2017, actualmente sólo dos explotaciones presentan una calificación T2- para la tuberculosis, lo que indica una clara tendencia a mejorar la situación existente en los últimos años.

Análisis del resultado de las diferentes pruebas diagnósticas realizadas

En la tabla 3 se presenta un resumen de los resultados diagnósticos con las diferentes metodologías aplicadas. Destaca en primer lugar el hecho de que de 17 positivos a la intradermotuberculinización (IDTB), ninguno lo fue a la Gamma-Interferón (γ -IFN), y de estos 4 resultaron positivos al cultivo y 7 negativos (de los 17 se intentó el cultivo sólo en 11 casos). De la misma forma se intentó el cultivo en 7 muestras más de animales IDTB positivos (en los que no se realizó el γ -IFN), en este caso el resultado determinó una falta de crecimiento en todos los casos.

En resumen por lo tanto:

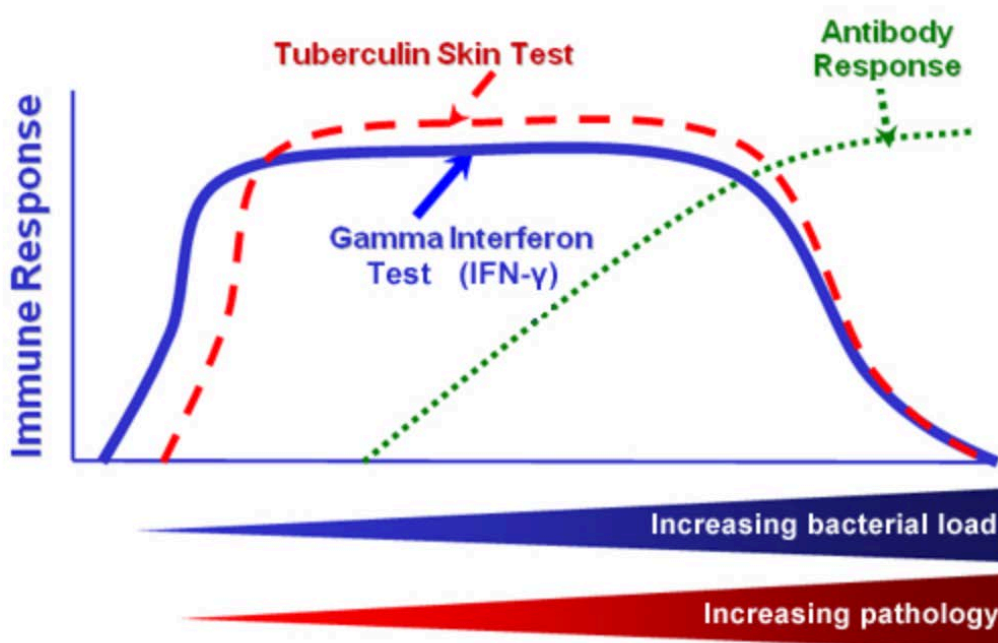
- el 100% de las muestras positivas a IDTB analizadas para el γ -IFN dio negativo (n=17)
- el 78% de las muestras positivas a IDTB en las que se hizo el cultivo no se obtuvo crecimiento para el Complejo Micobacterium tuberculosis o MTC (n=18), y sólo un 22% se obtuvo un cultivo positivo.

Tabla 3. Resultado comparativo de las diferentes pruebas diagnósticas llevadas a cabo.

Diagnóstico IDTB				
negativo	103 (94 hembras, 9 machos)			
positivo	40 (38 hembras, 2 machos)			
	Diagnóstico γ-IFN realizado			
	17 (hembras)	0 Positivos		
		17 negativos		
		Gamma	Cultivo	Animales
		negativo	Positivo	4 (hembras)
		negativo	sin crecimiento MTC	7 (hembras)
		no hecho	sin crecimiento MT	7 (6 hembras, 1 macho)

La aparente discrepancia entre los diferentes métodos de diagnóstico se viene achacando a la diferente evolución de la respuesta celular y humoral. En la figura 6 se presenta un esquema de esta evolución diferencial, relacionándolo con la excreción de bacterias y la aparición de lesiones.

Figura 6. Evolución diferencial de los test diagnósticos en función de la evolución de la respuesta inmune (Tomado de Pollock & Neill, 2002)



A la vista de esta figura no parece fácil explicar los resultados obtenidos, por lo que estimamos que aunque deben existir otros factores que expliquen por qué un determinado animal no presenta ningún tipo de sintomatología, da positivo al test de tuberculina, negativo al gamma interferón y sea negativo al cultivo.

Así no parece ser cierta la afirmación de algunos responsables del diagnóstico oficial en campo de que el γ -IFN disminuye la sensibilidad con respecto a la IDTB a medida que evoluciona la infección. Lo que es cierto es que el γ -IFN detecta animales infectados algo antes (días-semana) que la IDTB. Por ello en explotaciones T2 positivas se recomienda el uso de ambas técnicas en paralelo para incrementar la sensibilidad y limpiar la explotación cuanto antes, aunque hay que tener en cuenta que el programa nacional lo que indica es que, en este tipo de explotaciones, se deben sacrificar los animales positivos a una de las dos técnicas o a las dos (por lo que se corre el riesgo usando ambas pruebas de tener que sacrificar un número mayor de animales).

Según la información obtenida del formulario de las ganaderías Cárdenas, el 71,4% de las explotaciones realizaron la prueba de interferón a los animales positivos a tuberculina. Únicamente una explotación conoció el nivel de coincidencia entre las dos pruebas (33%, 1 positivo a interferón de los tres positivos a tuberculina analizados).

De la misma forma en el 28% de los casos se encontraron lesiones en matadero. Aunque en la mayoría de explotaciones (71%) se desconoce si se intenta aislar *Mycobacterium* en los animales sacrificados, una de ellas declara que SI se ha intentado y otra afirma que NO. En la que se ha intentado aislar el patógeno, no se consiguió crecer *Mycobacterium*. No obstante, se considera que el que los animales sacrificados por dar positivo en las pruebas de tuberculina no presenten lesiones en la canal puede considerarse algo normal ya que la presencia de lesiones, en condiciones normales es indicativo de que el animal se infectó hace tiempo y con la presión de diagnóstico que se realiza en las explotaciones T2 positivas es difícil que se detectan animales positivos con lesiones macro en matadero.

Análisis de asociación con los marcadores genéticos analizados

El estudio de asociación en enfermedades multifactoriales como es la tuberculosis (este término hace referencia a que la aparición de la enfermedad depende de múltiples factores, independientemente que el agente causal sea único) es necesario o un diseño a priori muy completo (con selección previa de las explotaciones y de los animales de forma que sean mínimos los factores relacionados con la enfermedad en los que difieran los animales) o un estudio poblacional de gran envergadura que permita estimar el efecto de dichos factores y su corrección previa al estudio de asociación de los marcadores a ensayar. Así pe., en el trabajo de Liu y cols. (2017) se puso un especial cuidado en la selección de animales con el fin de obtener dos grupos claramente diferenciados. Para ello se realizó un muestreo a partir de tres explotaciones de entre 200 y 400 animales cada una, cercanas geográficamente, y con un sistema

productivo similar. Las explotaciones tenían una incidencia a tuberculosis prácticamente igual (5%) y todas habían estado expuestas a la misma en los 12 meses previos al estudio. Los animales a los que se hizo el screening tenían aproximadamente 8 años de edad y se testaron con tuberculina y gamma interferón en un periodo de 20 días. De esta manera se asume que los factores que están contribuyendo a la aparición de la enfermedad son semejantes en esas tres granjas. De todos los animales analizados únicamente se seleccionaron 232 individuos que formaron 2 grupos claramente diferenciados. El grupo de los positivos consistió en 136 animales que dieron positivo a las pruebas de tuberculina e interferón y presentaron síntomas clínicos de enfermedad como anorexia, adelgazamiento, tos o disnea. El grupo control lo conformaron 96 animales que dieron negativo a ambos tests y no presentaban síntomas de enfermedad.

En el caso del estudio llevado a cabo también en el vacuno Holstein, Cheng y cols (2015) analizaron 150 animales de un rango de entre 1 y 5 años de edad. 60 de ellos se enviaron obligatoriamente a sacrificio después de dar positivo en el test de la tuberculina entre los años 2011 y 2014. Estos 60 animales constituyeron el grupo control tras confirmar el positivo en cultivo para *M. bovis*. El grupo control lo formaron 90 animales procedentes de explotaciones sin historial reciente de tuberculosis y tras dar negativo en el test de tuberculina.

En nuestro caso es totalmente imposible un diseño semejante por múltiples razones: el pequeño tamaño de las explotaciones donde hemos podido obtener muestras, la dificultad para el diagnóstico comparativo, la heterogeneidad de razas, tipologías de las explotaciones, edades de los animales etc. basta recordar que no hemos conseguido ninguna muestra con el diagnóstico confirmado de tuberculina y de gamma-interferón.

Estos dos grupos extrema y cuidadosamente diferenciados en el estudio de Lu y cols. (2017) mostraron las siguientes frecuencias alélicas en los SNPs (Tabla 4):

Se puede observar las claras diferencias en frecuencia de los alelos A y G del SNP3, con asociación altamente significativa de los genotipos AG y AA, y un tipo de herencia básicamente codominante (el heterocigoto presenta un menor riesgo de aparición de la enfermedad que el homocigoto AA). En el caso del SNP5 también se determinó una asociación entre el alelo G que determinaría una mayor resistencia a padecer la tuberculosis y una aparente herencia parcialmente dominante en este caso.

Nuestros resultados no han resultado estadísticamente significativos y aunque se han detectado diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas entre los animales positivos y negativos no han sido tan claras (aunque con tendencia equivalente a la mostrada por el anterior estudio). A este hecho contribuye todo lo anteriormente descrito (falta de un diseño previo, pequeño tamaño poblacional, existencia de animales de diferentes rebaños, razas, edades etc., así como un diagnóstico no 100% confirmado según nuestro parecer).

Tabla 4. Resultado de los genotipos de los SNP3, 5 y 6 en los grupos control y positivo en la población Holstein (adaptado de Lu y cols., 2017).

Locus	Genotipo	Asociación a Tb	Grupo Positivo	Grupo Control
SNP3	GG		40 (29.4%)	69 (71.9%)
	AG	> Susceptible	62 (45.6%)	27 (28.1%)***
	AA	> Susceptible	34 (25.0%)	0 (0%)***
	G		142 (52.2%)	165 (85.9%)
	A	> Susceptible	130 (47.8%)	27 (14.1%)***
SNP5	CC		71 (52.2%)	34 (35.4%)
	CG	> Resistencia	53 (39.0%)	42 (43.8%)***
	GG	> Resistencia	12 (8.8%)	20 (20.8%)***
	C		195 (71.7%)	110 (57.3%)
	G	> Resistencia	77 (28.3%)	82 (42.7%)***
SNP6	AA		75 (55.1%)	47 (49.0%)
	AT		49 (36.0%)	33 (34.4%)
	TT		12 (8.8%)	16 (16.7%)
	A		199 (73.2%)	127 (66.1%)
	T		73 (26.8%)	65 (33.9%)

A nivel global se puede observar las frecuencias de los genotipos y alelos del SNP3, 5 y 6 en la tabla 5:

Tabla 5. Resultado de los genotipos de los SNP3, 5 y 6 en los grupos control y positivo en la población de vacuno de carne muestreada.

Locus	Genotipo	Grupo Positivo	Grupo Control	Tendencia
SNP3	GG	24 (61,5%)	52 (52,5%)	> Sensibilidad
	AG	14 (35.9%)	42 (42.4%)	
	AA	1 (2.6%)	5 (5.1%)	> Resistencia
	G	62 (79.5%)	146 (73.7%)	(RR=127% Tuberculosis) OR=1,38
	A	16 (20.5%)	52 (26.3%)	(RR=79% Tuberculosis)
SNP5	CC	22 (64.7%)	52 (57.8%)	> Sensibilidad
	CG	11 (32.4%)	38 (42.2%)	> Resistencia
	GG	1 (2.9%)	0 (0.0%)	
	C	55 (80.9%)	142 (78.8%)	(RR=110% Tuberculosis) OR=1,13
	G	13 (19.1%)	38 (21.2%)	(RR=91% Tuberculosis)
SNP6	AA	33 (97.1%)	89 (98,9%)	
	AT	1 (2.9%)	1 (1.1%)	
	TT	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	A	67 (98.5%)	179 (99.4%)	
	T	1 (1.5%)	1 (0.6%)	

* ningún SNP resulto estadísticamente significativo. RR= Riesgo Relativo. OD=ODD Ratio

Se puede observar como en el caso del SNP3 el comportamiento es inverso al descrito por *Lu y cols.*(2017), ya que en nuestra población el alelo que conferiría una mayor resistencia a la tuberculosis sería el alelo A (con un Riesgo Relativo del 79% frente al 127 del alelo G) mientras que en el citado trabajo el alelo con mayor resistencia sería el G (con un RR del 56% frente al 179% del alelo A). El OR (Odd Ratio) indicaría que la probabilidad de padecer la tuberculosis un animal portador del alelo G es 1,38 veces superior a la del portador del alelo A del SNP 3 si ambos tipos de animales estuviesen sometidos al mismo tipo de factores predisponentes.

Si coincidimos con el citado trabajo en el caso del SNP5 en el que el alelo G determinaría una mayor resistencia (RR 91%) frente al alelo C (RR=110%), aunque con unos niveles de riesgo superiores a los de este autor (alelo G RR=75%).

Finalmente el SNP6 no parece jugar ningún papel relacionado con la mayor sensibilidad o resistencia a esta enfermedad, coincidiendo con los resultados de *Lu y cols.* (2017).

En la tabla 6 se presenta el resultado de las frecuencias encontradas para los haplotipos formados por la combinación de los SNP3 y 5.

Tabla 6. Resultado de los haplotipos de los SNP3 y 5 en los grupos control y positivo en la población de vacuno de carne muestreada.

Genotipo	Grupo Positivo	Grupo Control	Tendencia
AACG	0 (0.0%)	4 (4,4%)	
AAGG	1 (2.9%)	0 (0.0%)	
AGCC	1 (2.9%)	4 (4,4%)	
AGCG	12 (35.3%)	34 (37,7%)	> Resistencia RR=83%
GGCC	21 (61.7%)	46 (51,1%)	> Sensibilidad RR= 120% OR=1,29

Se puede observar como con la combinación de ambos se obtienen ratios de Riesgo Relativos más elevados. En este caso el genotipo más favorable sería el AGCG, que en la población muestreada estaría en una frecuencia del 36,3%, mientras que el genotipo menos favorable lo presentarían el 54% de los animales. En el caso de la raza Cárdena, en las tablas 7 y 8 se presentan las correspondientes frecuencias para los SNPs (tabla 7) y haplotipos (tabla 8).

Aunque los resultados no alcanzan el nivel de significación, se puede observar una tendencia en el mismo sentido que el detectado en el trabajo de *Lu y cols.* (2017) en el caso del SNP3 con una probabilidad de sufrir la tuberculosis 1,6 veces mayor en los animales portadores del alelo A que los del G. En los marcadores del SNP5 esta tendencia es menos clara, con una práctica igualdad en las frecuencias de ambos alelos en el grupo Positivo a la Tuberculina y el grupo Control.

Tabla 7. Resultado de los genotipos de los SNP3, 5 y 6 en los grupos control y positivo en la población de vacuno Cárdeno.

Locus	Genotipo	Grupo Positivo	Grupo Control	Tendencia
SNP3	GG	17 (77,3%)	17 (85%)	
	AG	5 (22,7%)	3 (15%)	
	AA	0 (0%)	0 (0%)	
	G	39 (88,6%)	37 (92,5%)	(RR tuberculosis 82%)
	A	5 (11,4%)	3 (7,5%)	(RR tuberculosis 122%) OR=1,58
SNP5	CC	14 (77,8%)	15 (83,3%)	
	CG	4 (22,2%)	3 (16,7%)	
	GG	0 (0%)	0 (0%)	
	C	32 (88,9%)	33 (91,7)	(RR tuberculosis 86%)
	G	4 (11,1%)	3 (8,3)	(RR tuberculosis 116%) OR =1,37
SNP6	AA	17 (94,4%)	17 (94,4%)	
	AT	1 (5,6%)	1 (5,6%)	
	TT	0 (0%)	0 (0%)	
	A	35 (97,2%)	35 (97,2%)	
	T	1 (2,8%)	1 (2,8%)	

El resultado de la comparación de las frecuencias del haplotipo SNP3 y 5 tampoco determina una tendencia clara, dado que las frecuencias de los dos haplotipos más frecuentes son prácticamente idénticas.

Tabla 8. Resultado de los haplotipos de los SNP3 y 5 en los grupos control y positivo en la población de Cárdena muestreada.

Genotipo	Grupo Positivo	Grupo Control	Tendencia
AACG	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
AAGG	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
AGCC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
AGCG	4 (22.2%)	3 (16,7%)	> Sensibilidad RR=118% OR= 1,43
GGCC	14 (77.8%)	15 (83,3%)	> Resistencia RR= 84%

Otra evidencia de la existencia de una mayor o menor resistencia de origen genético a una determinada enfermedad infecciosa (además de la frecuencia con que aparecen dicha enfermedades en los animales portadores de cada genotipo) es la edad con que se muestran sus síntomas (o es detectada). Así en aquellos genotipos que determinan una mayor resistencia la aparición suele ser más tardía, mientras que los portadores de los alelos más sensibles, la infección, o la manifestación de la enfermedad suele ser más temprana.

En el caso de la raza Cárdena Andaluza parece existir una buena correspondencia con las tendencias observadas en la tabla anterior (tabla 8):

Tabla 8. Edad promedio de los animales declarados positivos a la tuberculosis en la población de vacuno Cárdeno.

SNP3	Edad promedio
GA	6
GG	8,3
SNP5	
CC	8,3
CG	6,7
Haplotipo SNP3/5	
GA CG	6,7
GG CC	8,3

En el global de la población de Cárdena analizada, el alelo G del SNP3 considerado como el más favorable a la resistencia (RR=82%) se encuentra en una frecuencia superior al 90% (tabla 9). Por otro lado, el alelo C del SNP5, también favorable a la resistencia a TB (RR=86%) se encuentra también en una frecuencia muy elevada (superior al 90%). Esto tiene dos importantes lecturas, por un lado que la fuerte selección llevada a cabo por la Administración, eliminando los animales positivos, podría haber conseguido indirectamente la selección de los más resistentes y por otra que de confirmarse este hecho, no tendría mucho sentido el incluir este gen en la selección de los reproductores.

Tabla 9 Frecuencia de los genotipos de los SNPs analizados en la población de Cárdena Andaluza Muestreada

SNP3	Frecuencia	Porcentaje
GA	8	19
GG	34	81
SNP5		
CG	7	19,4
CC	29	80,6
HAPLOTIPOS		
GGCC	29	80,6,0
AGCG	7	19,4

Conclusiones

No ha sido posible demostrar una asociación estadísticamente significativa entre los marcadores analizados (relacionados con la efectividad del sistema inmunitario) y una mayor propensión o resistencia a padecer la tuberculosis bovina.

Esto no quiere decir que no lo exista, sino que pueden concurrir efectos ambientales tan fuertes que enmascaren dicha asociación. El relativamente pequeño tamaño de la muestra también puede contribuir a este hecho ya que no ha sido realizado un diseño a priori del experimento, existiendo una gran cantidad de efectos ambientales que no han sido controlados y que pueden tener una fuerte influencia en la mayor prevalencia a la enfermedad (pe la existencia de animales salvajes que sirvan de reservorio)... La falta de concordancia entre los sistemas de diagnóstico también ha podido contribuir a no obtener un resultado claramente significativo.

Se detectan no obstante tendencias hacia la existencia de alelos del SNP 3 y 5 que podrían determinar una mayor o menor resistencia a esta enfermedad (una mayor o menor casuística y una edad de aparición de la enfermedad mayor o menor).

En contraposición al conjunto de la población analizado, se observa que en el caso de la población de Cárdena, es el alelo G del SNP3 el considerado como mayor resistencia a TB (RR=82%) y también el mayoritario en la población al presentar una frecuencia de un 90,4%. A su vez, el alelo C del SNP5 también se considera como de mayor resistencia (RR=86%) apareciendo en una frecuencia de un 90,3%. Este hecho, de confirmarse indicaría que no tiene mucho sentido utilizar estos alelos en la selección de posibles reproductores (o al menos no darle un peso en la selección elevado).

Es necesario realizar para confirmarlas un estudio con un tamaño muestral superior y un diseño específico que minimice los efectos ambientales.

Recomendaciones

Realizar un análisis de bioseguridad en las explotaciones (al menos en las que sigan presentando casos positivos) para determinar qué factores están favoreciendo la persistencia de esta enfermedad.

Ampliar los marcadores a analizar (pe. mediante un chip de SNP de 70k)

Ampliar el análisis, realizando un estudio específico para el diagnóstico con todos los métodos disponibles y reevaluar los análisis de asociación

Citas Bibliográficas

Blackwell JM, Searle S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (lty/Lsh/Bcg). *Immunol Lett.* 1999; 65:73–80.

Blackwell y cols. 2000. Understanding the multiple functions of NRAMP1. *Microbes Infect.* 2000; 2: 317–321.

Blackwell y cols. 2001. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol.* 3(12): 773–784.

Cheng y cols., 2015. Relationship of Bovine SLC11A1 (Formerly NRAMP1) Polymorphisms to the Risk of Bovine Tuberculosis in Holstein Cattle. *J Veterinar Sci Technol* 6:247. doi:10.4172/2157-7579.1000247

Li y cols. 2011. SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 6(1): e15831. doi:10.1371/journal.pone.0015831.

Liu y cols., 2017. Association between SLC11A1(NRAMP1) polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Chinese Holstein cattle. *Tuberculosis* 103: 10-15.

Searle S, Blackwell JM. 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility". *Journal of Medical Genetics.* 36 (4): 295–9.

Pastor, JM. 2010. Plan de conservación de las razas autóctonas andaluzas en peligro de extinción: análisis poblacional, caracterización demográfica y de sus condicionantes sanitarios. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Pollock & Neill, 2002. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.* 163(2):115-27.

Rodero, y cols. 1994. Conservación de razas autóctonas andaluzas en peligro de extinción. Memorias provinciales.

Anexos:

I. Modelo de formulario para la recogida de información sobre factores predisponentes en la explotación

Ganadero:	
REGA:	

		Si	No	N/A	Descripción
1	Nivel de cumplimiento de medidas de la Administración				
1.1	Pruebas diagnósticas oficiales: 6 semanas IDTB y 6 meses gamma interferón				Se realizan las pruebas exigidas por la Administración a TODOS los animales y con la FRECUENCIA que determine
1.2	Se sacrifican los animales reaccionantes positivos cuando es ordenado por la Administración				Se realiza el sacrificio de los animales reaccionantes positivos en el plazo indicado por las Resoluciones Administrativas.
1.3	Se adoptan las medidas profilácticas en caso de detección de animales reaccionantes positivos				Se adoptan las medidas profilácticas indicadas por la Administración: En instalaciones, pastos, movimientos pecuarios e intensificación de pruebas diagnósticas.
1.4	Se aíslan los animales reaccionantes positivos del resto antes de su sacrificio				Inmediatamente tras el diagnóstico
1.5	Se realizan chequeos previos a los movimientos de animales				Según criterios de la Administración
1.6	Se realizan medidas de control sobre posibles reservorios silvestres				Según instrucciones de la Administración
1.7	Controles de campo				Se realizan los controles oficiales por parte de la Administración sobre los equipos de campo (Las pruebas son realizada por veterinarios de ADSG o de Directorio que se someten a los controles exigidos por la Administración).
2	Pruebas diagnósticas				
2.1.	Ha tenido animales positivos en 2016 o 2017				En caso de respuesta negativa, no continuar con el resto de preguntas
2.1.1	Cuantos pruebas se han realizado en 2016 y 2017				
2.1.2	Cuantos pruebas se han realizado en 2016 y 2017 con animales positivos				
2.1.3	Cuantos animales reaccionantes positivos han salido en total				Indicar el número de cada prueba
2.1.4	Cuantos animales se han investigado en total				Indicar el número de cada prueba
2.2	Se le han realizado a esos animales también la prueba de interferón				
2.2.1	Puede indicar el % de coincidencia entre las dos pruebas				Calculado mediante el cociente: Numerador: Animales positivos a las dos pruebas y en denominador: total de animales a los que se les ha realizado las dos pruebas

2.2.2	Se han encontrado lesiones en matadero				Se consideran lesiones simplemente que haya habido decomiso por encontrar ganglios afectados
2.2.3	Indicar el % de animales sacrificados CON LESIONES				
2.2.4	Se ha intentado aislar el Mycobacterium en algún animal sacrificado				
2.2.5	Se ha aislado el Mycobacterium en algún animal sacrificado				Indicar el número total de cultivos positivos y el número total de cultivos efectivamente realizados
3	Medidas de bioseguridad				
3.1	Medidas generales				
3.1.1	Estado general sanitario de la explotación: Existe un programa sanitario				Por ejemplo, uno genérico de la ADSG, si pertenecen a ella o existen pautas regulares de vacunaciones y desparasitaciones (Los dos).
3.1.1.1	Incluye enfermedades con efecto inmunodepresor: IBR, BVD y parásitos pulmonares				
3.1.1.2	Existen épocas del año en la que los animales están malnutridos				
3.1.1.3	Se suplementan los animales con sales o vitaminas en épocas de escasez				
3.1.1.4	Estos suplementos incluyen Calcio y vitamina D				
3.1.1.5	Se utilizan bloques de sal para el suministro. Indicar que otro método se usa				El uso de bloques donde lamen los animales aumenta la probabilidad de contagio
3.1.1.6	Indicar si alguna de estas medidas (3.1.1) se realiza también para ganado cinegético				Indicar cuales y para que especies
3.1.2	Pertenece a una ADSG				
3.1.3	Realiza la ADSG algún estudio u otra medida adicional, además de las pruebas diagnósticas				
3.1.4	Se automedican a los animales				Indicar si realiza tratamientos medicamentosos sin prescripción veterinaria
3.1.5	Los animales están correctamente identificados, facilitando el seguimiento individual				
3.1.6	Se realiza una limpieza y desinfección periódica de utensilios y material ganadero.				
3.1.7	Las instalaciones son suficientes y adecuadas para el manejo habitual y control veterinario				Instalaciones en la propia explotación, sin necesidad de desplazar los animales a otra cercana
3.1.8	Se comparten pastos con animales de otras explotaciones				

3.1.9	Agua: Los animales pueden acceder libremente a las fuentes de agua				Suficientes bebederos de forma que no compitan entre ellos a la hora de ir a beber, y no tengan que recorrer distancias largas cuando lo necesiten
3.1.10	Agua: Los bebederos se limpian regularmente				Limpieza grosera (No desinfección)
3.1.11	Agua: Se usa algún método de higienización del agua				Por ejemplo, adición de cloro entre 0,2 y 0,5 mg/litro
3.1.12	Agua: Los animales beben en charcas sin cercar				Aunque haya charcas sin cercar, responder NO si se sacan conducciones desde ellas a bebederos de fácil limpieza
3.1.13	Comederos: Existe número suficiente				De forma que evite la competitividad entre ellos y la excesiva concentración de ganado
3.1.14	Se aplican tratamientos contra roedores e insectos en las zonas de concentración de ganado				Para evitar que actúen como reservorios y transmisores de enfermedades en la explotación
3.1.15	En corrales y cebaderos: Se evita la alta concentración y se realizan tareas de limpieza periódicas				Contestar solo si disponen de estas instalaciones
3.1.16	Se realizan lotes homogéneos del ganado.	x			Valorar si la carga ganadera es adecuada y se evita el sobrepastoreo (Por ejemplo, si se debe suplementar al ganado con alimentos durante largos periodos, en un año "normal"). Indicar número de meses que se suplementa el ganado.
3.1.17	Se gestionan adecuadamente los purines y estiércol	x			Evitando que sean lavados por la lluvia y se produzcan lixiviados, canalice y maneje adecuadamente los residuos líquidos para evitar una contaminación cruzada
3.1.18	Vigila y aisle aquellos animales que presenten algún síntoma de enfermedad				O se encuentran excesivamente delgados
3.1.19	Informa a su veterinario sobre estos animales				Los de la pregunta 3.1.17
3.1.20	Deja cría de estos animales u otros que presenten enfermedades crónicas				Los de la pregunta 3.1.17 y especialmente de animales que hayan reaccionado positivamente a la prueba de diagnóstico de tbc
3.1.21	Se someten los animales nuevos a periodos de cuarentena tras su llegada				Pregunta si se compran animales de explotaciones de estatus sanitario desconocido
3.1.22	Se aplican tiempos de espera para la reutilización de pastos				Tras la detección en ellos de animales reaccionantes positivos. En explotaciones limpias : "N/A"
3.1.23	El mantenimiento y conservación del cerramiento de la explotación es adecuado				De forma que se evite el tránsito incontrolado y el contacto físico con animales de las explotaciones adyacentes

3.1.24	El transporte, la carga y descarga de animales se realiza con garantías sanitarias/bienestar animal.	x			Cumpliendo en todo momento lo legislado sobre estas materias, y evitando en la medida de lo posible el acceso a la explotación de los vehículos de transporte.
3.1.25	Es correcto el aislamiento y eliminación de los cadáveres.				Evite su acceso a insectos y otros animales carnívoros o silvestres con hábitos carroñeros (jabalí) que puedan propagar la enfermedad.
3.2	Cohabitación de animales domésticos con animales salvajes				
3.2.1	Indicar que especies salvajes hay en la explotación				En caso de no cohabitar especies silvestres, no realizar este apartado (Ninguna de 3.2)
	Ciervo				
	Jabalí				
	Corzo				
	Gamo				
	Lobo				
	Zorro				
	Lince				
	Muflón				
	Otro (Indicar solo especies de caza mayor):				
3.2.2	Acceden los animales salvajes a los mismos bebederos				
3.2.3	Acceden los animales salvajes a los comederos del vacuno				
3.2.4	Tiene vallados de exclusión o comederos o bebederos para vacuno. Indicar cuales				Por ejemplo vallados en charcas, o bebederos o comederos que por su altura o diseño impida el acceso de las especies salvajes
3.2.5	Se realiza alguna medida especial en verano u otoño (O cuando se suplemente a los animales)				Medida que impida se alimenten de forma conjunta el vacuno con las especies salvajes
	Medidas de emergencia cinegéticas si pertenecen a coto cinegético de caza mayor				
3.2.6	Se agota el cupo de captura de ciervo y jabalí				
3.2.7	Cree suficiente el cupo de captura de ciervo y jabalí en su explotación.				
3.2.8	Existen comederos para ciervo y jabalí				
3.2.9	Los comederos de ciervo y jabalí tienen al menos 250 metros y hay uno cada 250 Has.				
3.2.10	Los comederos de ciervo y jabalí están al menos a 500 metros de los de vacuno				
3.2.11	Los comederos de jabalí están a menos de 50 metros de las manchas				
3.2.12	La alimentación suplementaria del jabalí es exclusiva con maíz o es más del 50%				

3.2.13	Tiene contacto directo con la persona responsable del coto				
3.2.14	Se realiza eliminación higiénica de cadáveres tras las monterías				
3.2.15	Se realiza eliminación higiénica de cadáveres fuera de monterías				