

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Aplicación de herramientas cuantitativas para el estudio
epidemiológico de zoonosis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Luisa de la Cruz Conty

Directores

Lucas Domínguez Rodríguez
Julio Álvarez Sánchez

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos



TESIS DOCTORAL

**Aplicación de herramientas cuantitativas para el estudio
epidemiológico de zoonosis**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

María Luisa de la Cruz Conty

DIRECTORES

Lucas Domínguez y Julio Álvarez

Madrid, 2018



FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D. **Lucas Domínguez Rodríguez**, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense Madrid (UCM) y D. **Julio Álvarez**, contratado Ramón y Cajal en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense (UCM).

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título "**Aplicación de herramientas cuantitativas para el estudio epidemiológico de zoonosis**" ha sido realizada por la licenciada en Farmacia Dña. María Luisa de la Cruz Conty bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor Internacional por la Universidad Complutense.

Fdo. Lucas Domínguez

Fdo. Julio Álvarez

A mis padres y a mi hermana Julia

A mi tía Mimi y a mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Cuando una empieza la tesis se imagina escribiendo los agradecimientos y ahora que ha llegado ese momento, no sé por dónde empezar. Y precisamente por ello, puedo sentirme afortunada, porque han sido muchísimas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años y sin las cuales no habría sido capaz de alcanzar esta meta.

Lo primero, quiero agradecer a mis directores de tesis, porque esta tesis es tanto mía como suya. Lucas, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de VISAVET, por contagiarme a lo largo de estos años tu entusiasmo por la investigación y por enseñarme que no hay más límites que los que se pone una a sí misma. Y Julio, ¡qué decir! Has sufrido esta tesis tanto como yo. Gracias por iluminarme a lo largo de este camino, por hacer de la epidemiología una ciencia apasionante, por tu paciencia infinita dedicándome tantas horas sin esperar nada a cambio, por resolver mis ataques de desesperación con el humor que te caracteriza y por hacerme creer en mi misma. Gracias de corazón.

A mi grupo NED y, en especial, a Nerea, por haber sido siempre tan flexible y comprensiva conmigo.

A Pili y Alex, porque habéis estado siempre, en lo bueno y en lo malo; por tantas risas compartidas, pero también por haber sido un hombro sobre el que desahogarme, porque me llevo de VISAVET dos verdaderos hermanos.

A Mazas e Irene, porque no se puede tener mejores compañeras de despacho, porque habéis conseguido sacarme una sonrisa cada uno de los días que he compartido con vosotras, por poder hablar sin tapujos (ya me entendéis, jeje), por nuestros vicios compartidos y porque sois maravillosas.

A la maravillosa gente que he conocido a lo largo de estos años en VISAVET y que a día de hoy son verdaderos amigos: Fran, María de las Casas y González (y el paludismo, jajaja), Sonia, Eliazar, Adri, José, Vectorsito, Susana, Marga,

Fanny, las tres Irenes, Gabi, Alvarito, Isa, Luis, Elvira, Carmiña, Juanma, Picachu, Vero, Kelly, Almu, Coral y Clara. Millones de gracias por ser mi refugio, por todo vuestro cariño y apoyo, por las divertidísimas comidas y cigarrillos en compañía, por los inolvidables FNS y las escapadas de locura.

Gracias a todos los demás compañeros de VISAVET porque es un verdadero orgullo formar parte de esta gran familia. Lucía, gracias por ser tan valiente tomando las riendas del centro; Javi, Carmen Bárcena, Joaquín, Antonio, Lorena, Bea, Cris, Leydis, Pilar Liébana, Sonia Téllez... Gracias por haber sido tan atentos conmigo y porque, de una manera u otra, todos habéis puesto vuestro granito arena en esta tesis. Me gustaría hacer una mención especial al grupo SIC: Sergio, Carlos, Edu y Javi; por todo lo que me habéis sufrido estos años y por la maquetación de esta tesis, sois unos verdaderos artistas. Gracias a todas las chicas de ZTA, SEVEMUR y SOLDENE y al grupo de Bioseguridad por compartir siempre una sonrisa y por el interés y ánimo transmitidos, sobre todo en la recta final. Gracias a todos sin excepción.

A Olga Minguez, Anna Grau y Jesús Nácar, del Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León; a Rosa Díaz, Enrique Pagés, Jesús Carpintero y Yolanda Soriano, del Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid; a José Luis Sáez, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; a Mercedes Domínguez e Inmaculada Moreno, del Servicio de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III; a Christopher Barker, de la Universidad de California, Davis; a Ina Conrado y Andre Nault, de la Universidad de Minnesota; a Adam Branscum, de la Universidad de Oregón; muchísimas gracias por vuestra inestimable ayuda, sin la cual esta tesis no habría sido posible.

A Andrés Pérez, porque me recibiste con los brazos abiertos en mis estancias en el *Department of Veterinary Population Medicine* de la Universidad de Minnesota y porque me has aconsejado con mucho cariño desde que nos conocimos y, también al resto de amigos del otro lado del charco, especialmente a Cata, Mauri y Chochi, que hicisteis de Minnesota un lugar menos frío.

Gracias a Manuela Fernández, al personal de secretaría y al departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su paciencia y apoyo en toda la burocracia que rodea a un doctorado.

A todos aquellos profesionales que desinteresadamente comparten su conocimiento en la red a través de tutoriales en youtube y pacientes respuestas en foros; me habéis sacado de más de un apuro durante la tesis.

A Vega, mi pequeña astronauta, con quién he crecido y tanto he aprendido; gracias por ser una amiga tan maravillosa y por toda la fuerza que me has transmitido a lo largo de estos años.

A mis amigos del cole: Laura, Popi, Rocío, Cris, Nuria, Ana, Mar, David, Estefi, Carla y Hugo; gracias, porque da igual los años que pasen, siempre estáis a mi lado.

A mis boticarios: Victor, Guille, Estela, Varete, Miguel, Elena, Alvarito, Irene, Patri, Sandra, Kiti y Ana Bravo y, especialmente, a Anita, Laura, Pili, Alba y Javi; gracias por todo vuestro apoyo, por tantas risas y confianzas compartidas y por los bailes desenfrenados.

A mis niñas del Erasmus, Ana, Eva y Ale; quién nos habría dicho que a día de hoy seguiríamos siendo inseparables independientemente de los años que hayan pasado desde que coincidimos en la caótica Marsella. También a Suso y a toda la gente que formó parte de esa gran aventura.

Gracias Belén por cuidar tan bien de mí.

A Álvaro, por quererme y apoyarme incluso con mi cara menos amable. Por haberme levantado una y otra vez cuando ya no me quedaban fuerzas. Porque me has demostrado tanto este último año que ojalá algún día sea capaz de corresponderte. Por ser una persona llena de inquietudes que me ha enseñado a despertar las mías. Por compartir conmigo estos últimos cuatro años y que, espero de corazón, sean muchos más.

Quisiera agradecer a toda mi familia, pero, en especial, a mis abuelas. Abuela Carmina, siempre has estado orgullosa de mí y eso me ha empujado a esforzarme día a día. Quiero que sepas que esta tesis lleva también tu firma. Abuela Laura, gracias por tu amor incondicional. Os adoro.

A mi tía Mimi, verdadera fuente de inspiración; gracias por enseñarme a ver la vida con tus mismas gafas y porque siempre lo diste todo sin esperar nada a cambio. A mis abuelos, porque me llena de orgullo haber tenido unos abuelos como vosotros. Abuelo Felipe, gracias por todo lo que me enseñaste. Abuelo Roberto, gracias porque siempre creíste en mí, independientemente del camino que escogiera; te echo muchísimo de menos. Me habría encantado compartir este momento con vosotros tres.

Y, por último, sin lugar a dudas, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana Julia. No se puede expresar con palabras lo que siento. Gracias porque me lo habéis dado todo, siempre. Gracias mamá y papá por todos los sacrificios que habéis hecho porque tuviéramos lo mejor, por ser un ejemplo a seguir y por enseñarme que con esfuerzo todo es posible; gracias Julia por estar ahí 24 horas/7 días a la semana, por compartirlo todo, por escuchar todas mis comeduras de cabeza y darme los mejores consejos, y porque no se puede tener mejor hermana. Gracias a los tres por quererme tanto y tan bien y porque sin vosotros no sería la persona que soy hoy en día. Gracias.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	17
2.	SUMMARY	21
3.	INTRODUCCIÓN.....	25
3.1.	La epidemiología en sanidad animal	25
3.1.1.	Antecedentes históricos y evolución	26
3.1.2.	Aplicación de herramientas cuantitativas en epidemiología veterinaria	32
3.1.2.1.	Evaluación de técnicas diagnósticas.....	35
3.1.2.2.	Epidemiología espacial	51
3.1.2.3.	Monitorización de estrategias de vigilancia y control.....	76
3.1.2.3.1.	Revisión sistemática y meta-análisis.....	76
3.1.2.3.2.	Árboles de decisión en el análisis de escenarios	94
4.	OBJETIVOS	111
4.1	Objetivo I: Aplicación de la estadística Bayesiana para la evaluación de pruebas diagnósticas en ausencia de pruebas de referencia (<i>gold standard</i>).	111
4.2.	Objetivo II: Aplicación de técnicas de análisis espacial para el estudio de enfermedades animales en zonas de alta prevalencia.	112
4.3.	Objetivo III: Aplicación de herramientas cuantitativas para la monitorización de estrategias de vigilancia y control de enfermedades zoonósicas en el reservorio animal.	113
5.	OBJECTIVES	115
5.1.	Objective I: Application of the Bayesian approach for the evaluation of diagnostic tests in the absence of a perfect reference test.	115

5.2.	Objective II: Application of methods of spatial data analysis for the study of animal diseases in high prevalence areas.....	116
5.3.	Objective III: Application of quantitative methods in monitoring surveillance and control strategies of zoonotic diseases in the animal reservoir.....	117
6.	TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN.....	119
6.1.	Capítulo I.....	119
6.1.1.	Evaluación de la sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas (IFAT) y moleculares (PCR-directa) para el diagnóstico de leishmaniosis en lagomorfos mediante una aproximación bayesiana...	119
6.1.2.	Evaluación de la fiabilidad del kit IDvet para la prueba del γ -IFN en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en España.....	131
6.2.	Capítulo II.....	143
6.2.1.	Dinámica espacial de la tuberculosis bovina en la Comunidad Autónoma de Madrid, España (2010-2012).....	143
6.3.	Capítulo III.....	161
6.3.1.	Evaluación de la sensibilidad del Programa de Erradicación de la tuberculosis bovina en una región de alta prevalencia de España mediante un árbol de escenario.....	161
6.3.2.	La vacunación como estrategia de control de la infección por <i>Salmonella</i> en porcino: Revisión sistemática y meta-análisis de la literatura científica.....	201
7.	DISCUSIÓN.....	213
8.	CONCLUSIONES.....	239
9.	CONCLUSIONS.....	241
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	243
11.	ANEXOS.....	303
11.1	Estancias internacionales.....	303

11.2.	Participación en congresos	303
11.2.1.	Comunicaciones orales	303
11.2.2.	Comunicaciones en póster	304

1. RESUMEN

En la presente tesis doctoral se ha explorado la utilidad de la aplicación de técnicas de análisis cuantitativo para el estudio de la epidemiología de enfermedades de relevancia en sanidad animal y salud pública.

La mayor parte de estudios epidemiológicos se fundamentan en la clasificación de los individuos de la población en las categorías de infectado y no infectado en función de los resultados de una prueba diagnóstica. No obstante, con frecuencia la fiabilidad de esa prueba no se evalúa previamente, o bien dicha evaluación tiene lugar en unas circunstancias no aplicables posteriormente a la población de interés. En esta tesis se aplicó la estadística Bayesiana en dos escenarios muy diferentes con el fin de estimar la fiabilidad de pruebas diagnósticas ante-mortem. En primer lugar, se evaluó la fiabilidad de las pruebas tradicionales de diagnóstico de la leishmaniosis, la inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT) y la PCR anidada, en conejos y liebres, recientemente identificados como reservorios competentes del parásito *L. infantum* y sobre los que no existía información previa. En segundo lugar, se estudió el rendimiento de una prueba recientemente comercializada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (bTB) basada en la detección de gamma-interferón (kit IDvet), cuyo uso en el Programa Nacional de Erradicación de la bTB había sido autorizado apoyándose en el funcionamiento de otra prueba basada en el mismo principio. El primer trabajo reveló valores de sensibilidad y especificidad de IFAT en torno al 70-80%, lo que indica que esta prueba tendría potencial como herramienta de cribado de la leishmaniosis en conejos y liebres. La sensibilidad estimada de la PCR anidada fue en cambio limitada (<30%), cuestionando la utilización de esta segunda prueba en este contexto. En el segundo trabajo, la sensibilidad estimada del kit IDvet con el punto de corte recomendado por el fabricante fue del 36,7% (14,7-78,8), significativamente inferior a lo estimado con anterioridad para el kit Bovigam, utilizado en el marco del Programa Nacional de Erradicación de la bTB desde hace más de 10 años. Estos resultados sugieren la necesidad de

un reajuste del punto de corte del IDvet para su aplicación en un escenario epidemiológico de bTB como el de España.

Una vez establecida la fiabilidad de la herramienta diagnóstica, ésta puede emplearse en la evaluación de los patrones espacio-temporales de la enfermedad. En el tercer trabajo de esta tesis se emplearon técnicas de análisis espacial, en combinación con la caracterización molecular de aislados bacterianos, con el fin de identificar posibles áreas de persistencia de la bTB en la Comunidad de Madrid en el periodo 2010-2012, contribuyendo así al reconocimiento de los factores que limitan el progreso del Programa de Erradicación en esta región. Los resultados indicaron una distribución heterogénea de la bTB en la Comunidad de Madrid, con un marcado agrupamiento de explotaciones positivas en el norte de la región mantenido durante los tres años de estudio. La alta homogeneidad genética de las cepas aisladas y la autocorrelación espacial de los coeficientes de transmisión estimados sugirieron la existencia de transmisión entre granjas vecinas o bien el efecto de factores locales condicionando la epidemiología de la enfermedad.

El siguiente paso en un estudio epidemiológico es la integración de toda la información anterior para el diseño e implementación de estrategias de vigilancia y/o control. La evaluación continuada de la efectividad de dichas estrategias es fundamental, por lo que los siguientes trabajos de esta tesis tuvieron como objetivo el abordaje de esta tarea desde enfoques diferentes. Como sugieren los resultados del segundo estudio, el éxito del Programa Nacional de Erradicación de la bTB está limitado, en parte, porque las pruebas diagnósticas disponibles no son capaces de determinar correctamente el estado de infección por su agente causal [miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), principalmente *M. bovis*], lo que puede dar lugar a una clasificación incorrecta de las explotaciones infectadas como oficialmente libres de bTB (OTF) debido a la ausencia de reactores a la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB). Por ello, el cuarto trabajo tuvo como objetivo la estimación de la sensibilidad a nivel de rebaño del sistema diagnóstico actual, definida como la probabilidad de identificar mínimo un

animal reactor a una prueba aplicada en una población verdaderamente infectada, en explotaciones OTF de Castilla y León mediante la aplicación de un árbol de escenario. Los resultados del modelo revelaron que la IDTB es capaz de detectar en un primer saneamiento tres de cada cuatro explotaciones recién infectadas y que, tras dos saneamientos consecutivos en las mismas explotaciones, este número asciende hasta nueve de cada diez, lo que pone de manifiesto la importancia del análisis rutinario de explotaciones consideradas libres de enfermedad en áreas de alta incidencia. Respecto al análisis bacteriológico, se estimó que éste era capaz de confirmar la presencia de MTC en un promedio de dos de cada tres explotaciones recién infectadas y detectadas mediante la IDTB, subrayando la importancia de limitar el movimiento de ganado en explotaciones positivas a la IDTB incluso cuando no haya sido posible cultivar el agente causal. Por otro lado, la infección por *Salmonella enterica* es endémica en el cerdo en nuestro país y, debido a que el consumo de carne de cerdo procesada y/o cocinada incorrectamente está considerada una de las fuentes de salmonelosis de origen alimentario, existe una gran inversión en estrategias para minimizar su prevalencia a nivel de granja, entre las que se encuentra la vacunación. Sin embargo, la gran heterogeneidad de vacunas y protocolos existentes dificultan extraer conclusiones definitivas sobre su efectividad en campo, por lo que el quinto trabajo de esta tesis tuvo como objetivo aclarar esta cuestión mediante una revisión sistemática y meta-análisis de la literatura científica existente. La información extraída y analizada indicó que la vacunación frente a *Salmonella* presenta una efectividad significativa, aunque moderada (~30%), en la reducción de la prevalencia de colonización y/o excreción de los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* en ganado porcino, independientemente del tipo de vacuna (atenuada o inactivada) utilizada.

2. SUMMARY

The present doctoral thesis explored the usefulness of the application of quantitative analytic methods for the study of the epidemiology of diseases of relevance in animal and public health.

Most epidemiological studies are based on the classification of individuals from a given population as infected or uninfected based on the results obtained in a diagnostic test. However, often the accuracy of the test is not formally evaluated, or estimates obtained in a different (and non-applicable) context are merely extrapolated, what can lead to important biases. In this thesis, Bayesian models were applied in two very different scenarios in order to estimate the performance of several ante-mortem diagnostic tests. First, the accuracy of two diagnostic tests traditionally used for diagnosis of leishmaniasis in other species, the immunofluorescence antibody test (IFAT) and the nested PCR, was evaluated in rabbits and hares, that were recently identified as competent reservoirs of *Leishmania infantum*. Next, the performance of a recently commercialized test for diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) based on the specific detection of gamma-interferon in the blood of infected animals that had been authorized for use as part of the Spanish bTB Eradication Program, the IDvet kit, was assessed. Results of the first study estimated that the sensitivity and specificity of the IFAT were around 70-80%, thus suggesting the potential use of the IFAT as a screening tool for diagnosis of leishmaniasis in rabbits and hares. In contrast, the limited estimated sensitivity of the nested PCR (<30%) would discourage its use in this context. In the second study the estimated sensitivity of the IDvet test at the cut-off recommended by the manufacturer was 36.7% (14.7-78.8), significantly lower than estimates previously obtained for the Bovigam test, that had been used in the National bTB Eradication Program for over 10 years. These results point out the need of adjusting the IDvet cut-off for its application in the Spanish epidemiological setting.

Summary

Once the accuracy of the diagnostic test has been correctly determined, its results can be used as the basis for the evaluation of the spatio-temporal patterns of a disease. In the third study of this thesis, spatial analytic methods were used in combination with bacterial molecular characterization techniques to identify clusters of persistence of bTB in the region of Madrid in the period 2010-2012 to help recognize factors impairing the progress of the National Eradication Program in this region. Results demonstrated a heterogeneous distribution of the disease in Madrid, with a significant cluster of positive herds in the north of the region that was consistently identified throughout the study period. The high genetic homogeneity of the isolated strains and the spatial autocorrelation of the estimated transmission coefficients suggested the existence of local transmission events between neighboring farms and/or the effect of local factors shaping the epidemiology of the disease in the region.

The next step in an epidemiological study is the integration of the previous information in order to design and implement surveillance and/or control strategies. The constant evaluation of the efficacy of these strategies is fundamental; therefore, the following two studies in this thesis were focused on the evaluation of surveillance and control strategies for endemic diseases using different approaches. As suggested by the results of the second study, the success of the Spanish bTB Eradication Program is limited due in part to the fact that currently available diagnostic tests do not correctly determine the existence of an infection with the causative agent of bTB [members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), primarily *M. bovis*], what may lead to the misclassification of bTB infected herds as officially tuberculosis free (OTF) due to the absence of reactors in the single intradermal tuberculin (SIT) test. Therefore, the fourth study had the objective of estimating the herd sensitivity of the current diagnostic scheme at the herd level, defined as the probability of finding at least one reactor in a diagnostic test applied in a truly infected population, in OTF herds in the region of Castilla y León using scenario tree modeling. Model results revealed that the SIT test is able to detect three out of four newly infected herds in an initial herd-test and that, after two consecutive herd-tests carried out in the same herds, this number rises to nine

out of ten. These results highlight the importance of the routine testing of farms even when considered free of disease in an area of high incidence. Regarding the bacteriological analysis, according to the model it was able to confirm the presence of MTC infection in approximately two out of three newly infected herds detected through the SIT test. This underlines the importance of limiting cattle movement originating from SIT positive herds even when the causative agent has not been isolated until the presence of infection can be conclusively ruled out. On the other hand, infection with *Salmonella enterica* is endemic in pig herds in Spain and, because consumption of improperly processed or cooked pork is considered one of the sources of foodborne salmonellosis, large efforts are invested in strategies to reduce its prevalence at the herd level, among which vaccination is one of the main ones. However, the great heterogeneity in vaccines and vaccination protocols complicates determining its true efficacy on the field; therefore, the fifth study of this thesis aimed to clarify this issue through a systematic review and meta-analysis of the peer-reviewed scientific literature. The information extracted and analyzed indicated that vaccination against *Salmonella* leads to a significant although moderate (~ 30%) reduction in the prevalence of colonization and/or excretion of *S. Typhimurium* and *S. Choleraesuis* serotypes in swine, regardless of the vaccine type (attenuated or inactivated) used.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. La epidemiología en sanidad animal

En el último siglo, y especialmente desde mediados de la década de los sesenta, se han venido observando cambios en los sistemas de producción animal, dirigidos fundamentalmente hacia la optimización de la productividad, derivados de la adopción de un enfoque empresarial del sector pecuario (Infante-Amate et al., 2015; Soto Fernández et al., 2016). Esas nuevas condiciones han ido transformando el enfoque de la medicina veterinaria, tradicionalmente individual, hacia una perspectiva más poblacional, haciendo por tanto cada vez más necesario el aporte de la epidemiología (Thursfield, 2007). Desde entonces, la producción animal ha ido creciendo progresivamente a medida que lo hacía la demanda global (WHO/FAO, 2002), y con ella el reconocimiento de la utilidad de la epidemiología en este campo. Hoy en día la epidemiología juega un papel primordial debido al aumento del riesgo de epidemias y emergencia de enfermedades como consecuencia de la conectividad de los sistemas de producción y mercado a escala global (Perez, 2015).

La epidemiología en sanidad animal integra diversas disciplinas como la estadística, la microbiología, la biología molecular y la demografía; su objetivo es la investigación sistemática, e idealmente la cuantificación, de la dinámica de las enfermedades en poblaciones animales (Dohoo, 2003; Thursfield, 2007; Perez, 2015), y, como fin último, prevenir y/o controlar los resultados sanitario-productivos indeseables de la aparición de dichas enfermedades, sin descuidar a su vez cómo estos efectos interaccionan con la salud humana y el medioambiente (Hristovski et al., 2010; Teachers., 2017; Waltner-Toews, 2017).

Existen diversos métodos que pueden aplicarse con el fin de llevar a cabo la investigación epidemiológica de una enfermedad. La vigilancia y los estudios descriptivos se utilizan para analizar la frecuencia y distribución de una

enfermedad en cuestión (Thursfield, 2007) y, los estudios analíticos permiten evaluar hipótesis relacionadas con dicha distribución (Dohoo, 2003) que a su vez puedan conducir al diseño de medidas preventivas/correctoras, que puedan reducir la frecuencia de la enfermedad.

3.1.1. Antecedentes históricos y evolución

Los epidemiólogos han contribuido a la prevención y el control de las enfermedades transmisibles incluso antes de que su naturaleza infecciosa fuese comprendida. Los primeros ejemplos documentados de estudios epidemiológicos fueron desarrollados sobre enfermedades del hombre a mediados del siglo XIX.

En 1847 Ignác Semmelweiss, médico húngaro especializado en obstetricia, estableció la asociación entre determinadas prácticas y un incremento de la mortalidad materna debido a la aparición de fiebres puerperales en el hospital general de Viena (Noakes et al., 2008). Dado que la mortalidad era significativamente superior en la clínica asistida por médicos y estudiantes de medicina, que en muchos casos habían practicado necropsias a mujeres fallecidas por fiebres puerperales ese mismo día, Semmelweiss recomendó seguir un protocolo de desinfección de las manos con hipoclorito cálcico (antes de que la teoría de la infección por gérmenes se hubiera desarrollado), lo que redujo la mortalidad en el grupo expuesto desde el 18,3% registrado en abril de 1847 hasta el 1,2% registrado en julio de ese mismo año, igualando la tasa registrada en la clínica asistida exclusivamente por matronas, quienes no practicaban necropsias (Shorter, 1984). Una década después, en 1854 John Snow, médico inglés, llevó a cabo lo que hoy se denomina una "investigación de brote" al analizar los datos sobre las hasta 500 personas que fallecieron por diarreas en tan sólo 10 días en el barrio del Soho en Londres; cartografió en un plano la localización de los casos al igual que los pozos de agua allí presentes (Figura 1) y tomó muestras de estos últimos (Brody et al., 2000). Por entonces, predominaba la creencia en la teoría miasmática de la enfermedad, según la cual los miasmas, que eran el conjunto de efluvios malignos que desprendían cuerpos enfermos, materias corruptas o aguas estancadas, eran

la causa de enfermedad. Sin embargo, Snow llevaba años defendiendo la teoría de que estas diarreas se transmitían por la ingestión de una "materia mórbida", materia que había de reproducirse y eliminarse por las deposiciones, las cuales terminaban en aguas del Támesis (Cerdeira Lorca and Valdivia, 2007). Gracias a esa investigación fue capaz de demostrar que existía una relación entre el consumo de agua procedente de una fuente pública específica, ubicada en Broad Street, y el riesgo de padecer cólera (una enfermedad cuyo agente etiológico era entonces desconocido) y asentó las bases de la teoría microbiana de la enfermedad (Newsom, 2006). La clausura de esta fuente contribuyó a la disminución de la epidemia. La metodología utilizada por ambos, Semmelweis y Snow, se caracteriza por la recogida sistemática de datos, la formulación de una hipótesis a partir de la exploración de dichos datos, la realización de una investigación para el contraste de dicha hipótesis mediante el uso de herramientas analíticas, y la aplicación de los resultados de dicha investigación para favorecer la toma de decisiones (Pfeiffer, 2002). Esta metodología está considerada el cimiento de la epidemiología moderna.



Figura 1. Mapa realizado por John Snow sobre el brote de cólera en Londres (1854); los puntos indican la residencia de los afectados por cólera, y las cruces la posición de las fuentes en el barrio del Soho (adaptado de Pfeiffer, 2008).

Las herramientas analíticas a través de las cuales los estudios epidemiológicos pueden alcanzar todo su potencial se empezaron a aplicar en el campo de la salud pública aún antes, alrededor de 1766, cuando se reconoció el valor y la aplicabilidad de los modelos matemáticos en cuestiones de salud pública. En ese año Daniel Bernoulli, matemático y médico neerlandés-suizo, se encontraba trabajando en el análisis matemático de los beneficios de la inoculación del polvo extraído de costras de enfermos de viruela para prevenir dicha enfermedad y ya concluyó que “en aspectos que están directamente relacionados con el bienestar del ser humano, ninguna decisión debería ser

tomada sin la información que un simple análisis y cálculo puede aportar” (Blower and Bernoulli, 2004). Su trabajo constituye la primera aplicación de un modelo matemático para el estudio de la dinámica de una enfermedad infecciosa, y demostró que a pesar de los riesgos que existían para el hombre, la inoculación de viruela era beneficiosa para la sociedad ya que aumentaba la esperanza de vida en más de un promedio de 3 años (Blower and Bernoulli, 2004).

Partiendo de las experiencias de Snow y Semmelweis, métodos analíticos similares han sido aplicados para prevenir y controlar el impacto de enfermedades incluso en ausencia de información etiológica sobre las mismas. Dichas aplicaciones en el campo de la salud pública fueron documentadas sobradamente a lo largo de los años, pero no fue hasta 1866 cuando fue descrita por primera vez su aplicación en sanidad animal: William Farr, médico inglés pionero en la recolección de datos estadísticos sobre enfermedad y mortalidad, aplicó la curva de epidemia o Campana de Farr, que había desarrollado con anterioridad y a través de la cual describía el desarrollo de una epidemia (parecida a una curva normal), en el análisis de la epidemia de peste bovina acontecida ese año en Inglaterra, prediciendo el curso y término de ésta (Farr, 1866).

Unos años después (1880-1890), Daniel Salmon y Frederick Kilborne concluyeron que un insecto (en concreto, una garrapata, *Boophilus annulatus*) estaba asociado con una enfermedad del ganado vacuno denominada “Fiebre de Texas”, aunque el agente causal (*Babesia bigemina*) no fue descubierto hasta años después (Schwabe, 1981). Su conclusión se basó en las similitudes entre la distribución geográfica de la enfermedad y la extensión del hábitat natural de la garrapata. Este trabajo sentó la base para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad, tales como tanques de baño con soluciones de arsénico donde se sumergía el ganado para la eliminación de las garrapatas (Figura 2), y apuntó a la primera hipótesis sobre un mecanismo de propagación de un agente causal a través de un vector, necesario para su desarrollo y transmisión. A raíz de este descubrimiento y a lo largo de la segunda mitad del siglo XIX, predominó el estudio de los problemas

de salud centrado en el análisis de los múltiples factores presentes en el ambiente que pudieran estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad (Dohoo, 2003).



Figura 2. Estación de eliminación de garrapatas del ganado vacuno a finales del siglo XIX en Estados Unidos (extraído: www.nal.usda.gov/exhibits/speccoll/items/show/7871)

Fue a finales de este siglo, y hasta la mitad del siglo XX, cuando el concepto de causa multifactorial perdió apoyos debido a que, tras los experimentos de Koch, la búsqueda de agentes etiológicos específicos dominó la investigación médica. Robert Koch, médico y microbiólogo alemán, descubrió el bacilo de la tuberculosis y del cólera, y formuló en 1884 los denominados “postulados de Koch” a raíz de sus experimentos con *Bacillus anthracis*, que establecen las condiciones para que un organismo sea considerado la causa de una enfermedad; posteriormente, estos postulados se generalizaron para el resto de enfermedades infecciosas (Metchnikoff, 2006; Lakhtakia, 2014). Los postulados de Koch defendían lo siguiente: el agente patógeno debe estar presente en los animales enfermos y ausente en los sanos; el agente debe poder ser aislado en cultivo axénico; el agente aislado debe provocar la enfermedad en un animal susceptible al ser inoculado y; el agente aislado de las lesiones producidas en este último animal de experimentación debe ser

exactamente igual al aislado originalmente (Evans, 1976). Los numerosos experimentos y descubrimientos llevados a cabo durante esta "era dorada" de la microbiología trajeron consigo numerosos logros como el testeo masivo, la inmunización, tratamientos específicos, al igual que el control de vectores como métodos para el control de enfermedades. Pero a medida que se controlaban las enfermedades infecciosas ganaban importancia otras crónicas, en ocasiones no infecciosas, como causas de morbilidad y mortalidad, sobre todo en los países industrializados (Dohoo, 2003). Fue entonces, a mitad del siglo XX, cuando se reconoció que ciertos agentes aislados no eran siempre los responsables únicos de dichas enfermedades, y se iniciaron estudios a gran escala, tanto en salud pública como en sanidad animal, con el fin de examinar las múltiples causas potenciales de las enfermedades crónicas. Por ejemplo, en 1957, los británicos iniciaron una encuesta a nivel nacional con el fin de investigar y retratar la situación sanitaria del ganado, en concreto de la industria lechera, en ese momento (Leech, 1971). Por lo tanto, a principios de la década de los sesenta, crecía de nuevo la conciencia sobre la existencia de una red compleja de causalidad en el origen de muchas enfermedades relevantes en salud pública y sanidad animal.

Cabe resaltar como, a finales de la década de los 80 tuvo lugar un suceso, y de una importante repercusión mediática, que nuevamente demostró la utilidad de la investigación epidemiológica y cómo la salud pública y la sanidad animal están en estrecha conexión: el control de la epidemia de encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en Reino Unido. Esta enfermedad fue identificada por primera vez en 1986 tras una investigación clínica y patológica de una vaca derivada al Laboratorio Veterinario Central del Ministerio de Agricultura de este país (Wells et al., 1987). Se observó que los signos clínicos guardaban una gran similitud con aquellos de la tembladera en ovejas, aunque nunca antes se habían descrito en ganado vacuno. Los casos de BSE en ganado vacuno fueron en aumento y en 1988-1989 comenzaron las investigaciones epidemiológicas, bajo la sospecha de que el rápido desarrollo de la epidemia podía deberse a la ingesta de carne y productos derivados de rumiantes enfermos (Wilesmith et al., 1988; Wilesmith et al., 1991; Donnelly

et al., 1997). Como consecuencia de la evidencia epidemiológica apuntando a una asociación de las proteínas derivadas de rumiantes con la aparición de BSE, y en ausencia de una evidencia convincente de su agente etiológico, se llevó a cabo la retirada de estas proteínas de la alimentación animal, actuación que redujo definitivamente la incidencia de la enfermedad (Taylor and Woodgate, 1997).

Fue en la década de los noventa cuando se desarrolló la denominada "investigación epidemiológica de campo" (Dohoo, 2003). En este marco de trabajo se estableció que los elementos que constituyen las características sociales, físicas y biológicas que definen un ecosistema deben tenerse en cuenta en cada estudio epidemiológico, mientras que la unidad de análisis puede variar desde el individuo, a grupos (parideras, establo, lote), explotaciones, municipios, o amplios ecosistemas (Dohoo, 2003). Así es como actualmente la investigación epidemiológica continúa estrechamente ligada al concepto de múltiples factores causales interrelacionados como origen de las enfermedades, que deben ser tenidos en cuenta para el desarrollo de estrategias de control y prevención. El estudio de estas redes causales se ve muy facilitado por el progreso en el desarrollo de herramientas cuantitativas de investigación, objeto de investigación de esta tesis doctoral.

3.1.2. Aplicación de herramientas cuantitativas en epidemiología veterinaria

El estudio epidemiológico de una enfermedad se compone de varios pasos, desde la mera descripción de su ocurrencia en una población hasta el desarrollo de modelos que permitan incluso la predicción del comportamiento de un patógeno en otras poblaciones (Figura 3). Para poder alcanzar los objetivos necesarios en las investigaciones epidemiológicas existen diferentes aproximaciones analíticas.

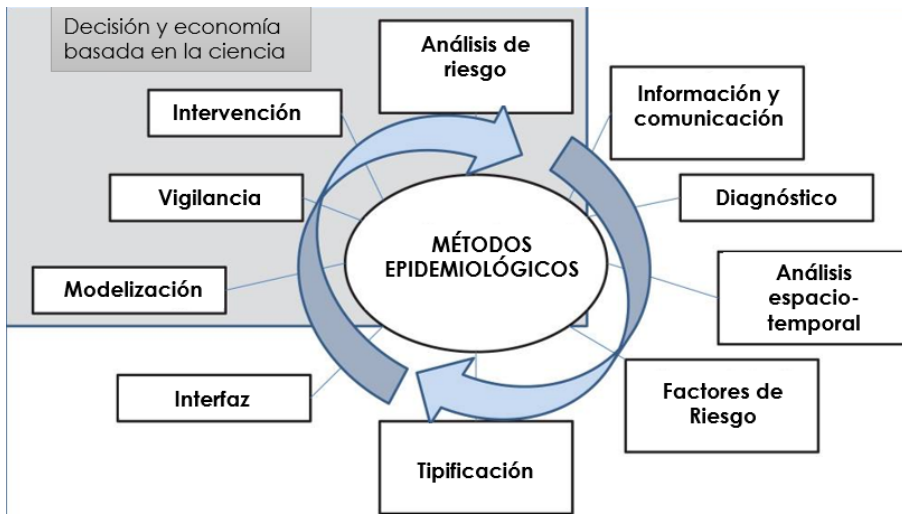


Figura 3. Fases de la investigación sistemática de la epidemiología de una enfermedad infecciosa (adaptado de Pérez, 2015).

Los estudios epidemiológicos se basan en la información generada en el campo, entendiéndose éste por el terreno de investigación, ya sean hospitales, explotaciones ganaderas, medio silvestre, etc., cuya recogida es un paso imprescindible y decisivo para el desarrollo de las siguientes fases del estudio. Su importancia se identificó mucho tiempo atrás, de modo que a principios del siglo XVII ya se empezaron a recoger de forma rutinaria datos sobre morbilidad, mortalidad, causas de fallecimiento y censo de la población en Reino Unido (Heesterbeek and Roberts, 2015); en primer lugar, debido a los brotes de peste, y posteriormente empleados para, por ejemplo, el cálculo de la esperanza de vida. John Gaunt fue pionero en la compilación de dicha información mediante las denominadas “facturas de mortalidad”, que eran cuentas semanales sobre entierros y bautizos (Graunt, 1977); al igual que Edmund Halley, quién desarrolló y publicó la primera tabla de vida (Halley, 2016), que posteriormente empleó Bernoulli en 1760 para el cálculo del esperado cambio en el promedio de esperanza de vida tras la inoculación de viruela (Heesterbeek and Roberts, 2015). Esta práctica se extendió posteriormente al campo de la sanidad y producción animal, como ya vimos en el apartado anterior, con la contribución de William Farr (Farr, 1866).

En referencia a la recogida de información de campo, los avances recientes en el área de la epidemiología veterinaria permiten de manera creciente el análisis del denominado *Big Data*, que hace referencia a las grandes bases de datos, especialmente complejas, que no pueden ser analizadas mediante métodos tradicionales (Song and Ryu, 2015), así como el desarrollo informático de los sistemas de vigilancia de enfermedades, cuyo objetivo es la recogida y análisis de la información y la comunicación de los resultados para el apoyo en la toma de decisiones prácticamente en tiempo real (Willeberg et al., 2010).

Para la adecuada recogida y evaluación de esa información en el campo es necesario entender los atributos y limitaciones de las pruebas diagnósticas que se emplean para definir el estado de salud o enfermedad de los individuos analizados. Importantes progresos en este terreno logrados en las últimas décadas están relacionados con el uso de la estadística bayesiana para la estimación de la precisión de las pruebas diagnósticas en campo en ausencia de una prueba de referencia (Branscum et al., 2004, 2005).

Siguiendo con el ciclo de análisis de una investigación epidemiológica, y una vez recogida la información sobre ocurrencia de una enfermedad en una o más poblaciones, posteriormente pueden analizarse los patrones de la enfermedad con el fin de identificar las relaciones espaciales, temporales o espacio-temporales que definen su incidencia y prevalencia. Para ello, y especialmente en ciencias veterinarias desde la década de los 90, se emplean las herramientas GIS y los análisis geoespaciales y de series temporales (Ward and Carpenter, 2000a; Ward and Carpenter, 2000b; Perez et al., 2011a).

La influencia de factores ambientales, antropogénicos y demográficos en la ocurrencia de una enfermedad pueden ser también cuantificados. Existe una gran variedad de herramientas y programas informáticos que se emplean en el análisis multivariable, capaces de incorporar aleatoriedad y jerarquias, además de lidiar con grandes números de covariables, lo que permitirá determinar el impacto de múltiples factores en la aparición de una enfermedad al mismo tiempo (Pfeiffer and Stevens, 2015). Al tratarse los

agentes etiológicos de organismos dinámicos que evolucionan, cambian y se adaptan, estos análisis se extienden para incorporar también variables sobre las relaciones genéticas y evolutivas de éstos (Alkhamis, 2015; Cilingir, 2015). De igual manera, la interfaz con otras poblaciones y sistemas, incluyendo la naturaleza zoonótica de enfermedades, debe ser evaluada para considerar las potenciales inter-conexiones y relaciones (Perez, 2015).

Tras el conjunto de análisis anterior, esencialmente descriptivo y cuyo principal objetivo es la generación de hipótesis y su evaluación, la información puede integrarse en modelos epidemiológicos que describen la dinámica de enfermedades en una población y entre poblaciones diferentes. Estos modelos se emplean en la evaluación de estrategias de vigilancia y control, así como en la estimación del riesgo de introducción de la enfermedad en poblaciones susceptibles (Perez et al., 2011b; Alvarez et al., 2014a), como herramienta de apoyo en la toma de decisiones.

3.1.2.1. Evaluación de técnicas diagnósticas

La mayor parte de estudios epidemiológicos se fundamentan en la clasificación de los individuos de la población en las categorías de infectado (o enfermo) y no infectado (o susceptible) en función de los resultados de una prueba diagnóstica para posteriormente evaluar la asociación de distintos factores con dichas categorías. No obstante, con frecuencia la fiabilidad de esa prueba diagnóstica no se evalúa o se asume en función de estudios previos basados en supuestos que no tienen por qué ser aplicables al contexto en el que se utilizan posteriormente.

La determinación de la fiabilidad de las pruebas diagnósticas debería ser un requisito imprescindible previo a la realización de cualquier estudio sobre una enfermedad en una población, ya que en caso de introducir un error sistemático en la clasificación de los individuos puede sesgar de manera importante los resultados de un análisis (Leeflang et al., 2008; Schmidt and Factor, 2013).

En el caso de ciertas enfermedades de importancia en sanidad animal sometidas a programas de vigilancia y control de enfermedades esta circunstancia tiene gran importancia, ya que dichos programas se basan normalmente en la detección temprana de animales infectados mediante el uso de pruebas diagnósticas. En el caso de que estas herramientas no funcionen adecuadamente dichas tareas de vigilancia y control podrían llevar a resultados erróneos.

Son numerosos los factores relacionados con el hospedador, el patógeno o el medio ambiente que influyen en el rendimiento de las pruebas diagnósticas; por ello, la extrapolación de resultados obtenidos en diferentes contextos epidemiológicos puede dar lugar a conclusiones sesgadas y erróneas (Thursfield, 2007).

Cuando se aplica una prueba diagnóstica en una muestra de individuos cuyo estado de infección se conoce, la distribución de los posibles resultados sería la siguiente (Tabla 1):

Tabla 1. Distribución de los posibles resultados en una prueba diagnóstica en función del estado de infección de los individuos analizados (VP= verdaderos positivos; FN= falsos negativos; FP= falsos positivos; VN= verdaderos negativos).

		Estado real de los individuos	
		Infectados	No infectados
Resultados de la prueba diagnóstica	Positivos	a = VP	c = FP
	Negativos	b = FN	d = VN

Por lo tanto, los individuos infectados pueden dar un resultado positivo en la prueba diagnóstica (a), lo que los convertiría en verdaderos positivos, o dar un resultado negativo (b), siendo por tanto falsos negativos; de igual forma, los individuos no infectados pueden reaccionar en la prueba (c) (falsos positivos) o dar un resultado negativo (d) (verdaderos negativos).

La sensibilidad (*Se*) y la especificidad (*Sp*) son propiedades normalmente consideradas inherentes a una prueba diagnóstica. La sensibilidad es la probabilidad de identificar los individuos que realmente están infectados, mientras que la especificidad es la probabilidad de confirmar que la infección está ausente cuando realmente es así (Šimundić, 2009; Bee Wong and Hsiang Lim, 2011; Okeh, 2013; Kumar, 2016) como reflejan las ecuaciones (1 y 2) a continuación:

$$Se = \frac{a}{a + b}; Sp = \frac{d}{c + d} \quad (1,2)$$

Por otro lado, los valores predictivos de una prueba diagnóstica indican la confianza que se puede tener en que un resultado positivo a la prueba diagnóstica sea sinónimo de presencia de infección (valor predictivo positivo, VPP) o que un resultado negativo sea sinónimo de ausencia de infección (valor predictivo negativo, VPN) (Kumar, 2016), como reflejan las ecuaciones (3 y 4) a continuación:

$$PPV = \frac{a}{a + c} = \frac{Se * prevalencia}{Se * prevalencia + (1 - Sp) * (1 - prevalencia)} \quad (3)$$

$$NPV = \frac{d}{b + d} = \frac{Sp * (1 - prevalencia)}{(1 - Se) * prevalencia + Sp * (1 - prevalencia)} \quad (4)$$

Estos indicadores de la fiabilidad de una prueba diagnóstica dependerán, por tanto, además de la propia sensibilidad y especificidad, de la prevalencia de la enfermedad (Ver Figura 4).

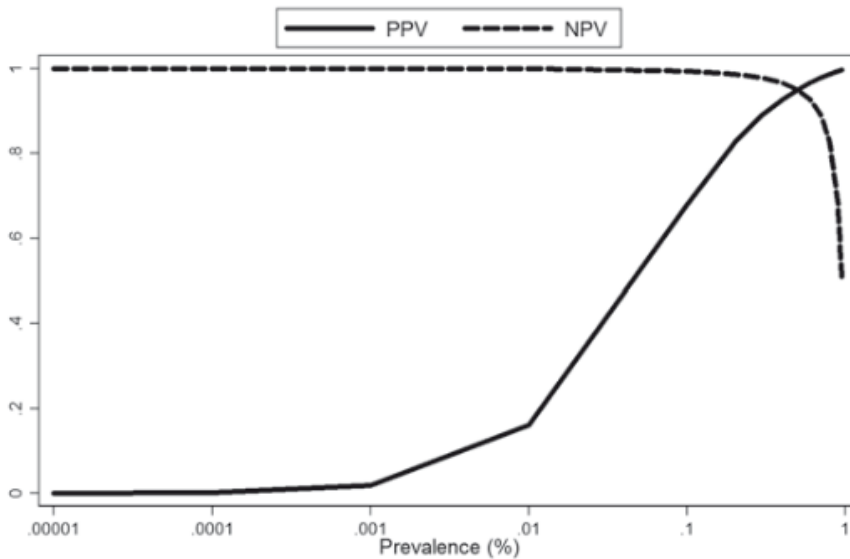


Figura 4. Valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) de una prueba diagnóstica en función de la prevalencia asumiendo una sensibilidad y especificidad constante del 95% en ambas (extraído de Bee Wong and Hsiang Lim, 2011).

Finalmente, la utilidad de una prueba diagnóstica también se puede evaluar mediante la razón de verosimilitud (*likelihood ratio*, LR), que expresa la probabilidad de que un determinado resultado se observe en infectados vs dicha probabilidad en individuos no infectados, tratándose de la razón de verosimilitud positiva (LR+) cuando este resultado es positivo y de la razón de verosimilitud negativa (LR-) cuando es negativo (Kumar, 2016), como reflejan las ecuaciones (5 y 6) a continuación:

$$LR+ = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}} = \frac{Se}{1-Sp}; LR- = \frac{\frac{b}{a+b}}{\frac{d}{c+d}} = \frac{1-Se}{Sp} \quad (5,6)$$

Generalmente, la estimación de los atributos de las pruebas diagnósticas descritos anteriormente se realiza por comparación con una prueba considerada de referencia, o *gold standard* (Kraemer, 1992), con la que se tiene una amplia experiencia en campo y por tanto se confía en su

capacidad de clasificar correctamente a los individuos de acuerdo a su estado real de infección (Greiner and Gardner, 2000). En muchas ocasiones, esta prueba de referencia es cara, de difícil realización o demasiado invasiva para su uso extendido, y por ello se recurre a pruebas alternativas, de las que es necesario conocer su fiabilidad. Dicha fiabilidad se determina entonces en comparación con esa prueba de referencia, asumiendo que el rendimiento de esta última es por tanto perfecto. No obstante, este supuesto es difícil de cumplir y, especialmente en el caso de ciertas enfermedades de difícil diagnóstico, el asumirlo puede dar lugar a estimaciones sesgadas (Staquet et al., 1981; Valenstein, 1990). Por lo tanto, el estudio de aproximaciones analíticas alternativas para la determinación de la fiabilidad diagnóstica de las pruebas es una disciplina de gran importancia.

La primera solución para la estimación de la fiabilidad de pruebas diagnósticas en ausencia de un *gold standard* puede encontrarse en el trabajo de Hui y Walter (Hui and Walter, 1980), quienes trabajaron bajo el supuesto de la aplicación simultánea de dos pruebas diagnósticas (cuyas sensibilidades y especificidades se desconocían) con resultados condicionalmente independientes entre sí (es decir, el resultado en una prueba es independiente del registrado en la otra) en individuos pertenecientes a dos poblaciones con diferentes prevalencias de infección (y asumiendo que la fiabilidad de las pruebas no varía entre poblaciones). Estos investigadores demostraron que la sensibilidad y la especificidad de ambas pruebas, al igual que la prevalencia real de infección en las dos poblaciones, podían estimarse basándose en los resultados cruzados de las dos pruebas (como los recogidos en la Tabla 2), mediante el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*; ML).

Tabla 2. Distribución de los resultados a dos pruebas diagnósticas aplicadas simultáneamente en dos poblaciones.

			Resultados a la Prueba 1	
			Positivos	Negativos
Población "A"	Resultados	Positivos	a ₁₁	a ₂₁
	Prueba 2	Negativos	a ₁₂	a ₂₂
Población "B"	Resultados	Positivos	b ₁₁	b ₂₁
	Prueba 2	Negativos	b ₁₂	b ₂₂

*a₁₁ (b₁₁) = frecuencia de individuos positivos a ambas pruebas diagnósticas en la población "A" (población "B"); a₁₂ (b₁₂) = positivos a la primera prueba y negativos a la segunda; a₂₁ (b₂₁) = negativos a la primera prueba y positivos a la segunda; a₂₂ (b₂₂) = negativos a ambas pruebas.

Como puede apreciarse, la Tabla 2 está compuesta por dos tablas 2x2; cada tabla 2x2 consta de tres grados de libertad, entendiendo éstos por el número de casillas en la tabla que pueden variar su valor libremente sin que el tamaño total de la población cambie; por tanto, la Tabla 2 aporta seis grados de libertad, que equivaldría al número de parámetros a estimar (las Se y Sp de ambas pruebas diagnósticas y las prevalencias de infección de las dos poblaciones) con los datos observados. Si los grados de libertad superasen el número de parámetros, la estimación no podría llevarse a cabo (Hui and Walter, 1980; Jones et al., 2010).

Las estimaciones ML son el conjunto de estimaciones de los parámetros (Se1, Sp1, Se2, Sp2 y prevalencias) que con mayor probabilidad (de ahí su nombre) han generado los datos observados, y que se obtienen maximizando la función de probabilidad (Tanner, 1996) (Ecuaciones 7-14).

$$p_{a11} = piA * Se1 * Se2 + (1 - piA) * (1 - Sp1) * (1 - Sp2) = \frac{VP_{A1y2} + FP_{A1y2}}{N} \quad (7)$$

$$p_{a12} = piA * Se1 * (1 - Se2) + (1 - piA) * (1 - Sp1) * Sp2 = \frac{VP_{A1} + FN_{A2} + FP_{A1} + VN_{A2}}{N} \quad (8)$$

$$p_{a21} = piA * (1 - Se1) * Se2 + (1 - piA) * Sp1 * (1 - Sp2) = \frac{FN_{A1} + VP_{A2} + VN_{A1} + FP_{A2}}{N} \quad (9)$$

$$p_{a22} = p_{iA} * (1 - Se1) * (1 - Se2) + (1 - p_{iA}) * Sp1 * Sp2 = \frac{FN_{A1y2} + VN_{A1y2}}{N} \quad (10)$$

$$p_{b11} = p_{iB} * Se1 * Se2 + (1 - p_{iB}) * (1 - Sp1) * (1 - Sp2) = \frac{VP_{B1y2} + FP_{B1y2}}{N} \quad (11)$$

$$p_{b12} = p_{iB} * Se1 * (1 - Se2) + (1 - p_{iB}) * (1 - Sp1) * Sp2 = \frac{VP_{B1} + FN_{B2} + FP_{B1} + VN_{B2}}{N} \quad (12)$$

$$p_{b21} = p_{iB} * (1 - Se1) * Se2 + (1 - p_{iB}) * Sp1 * (1 - Sp2) = \frac{FN_{B1} + VP_{B2} + VN_{B1} + FP_{B2}}{N} \quad (13)$$

$$p_{b22} = p_{iB} * (1 - Se1) * (1 - Se2) + (1 - p_{iB}) * Sp1 * Sp2 = \frac{FN_{B1y2} + VN_{B1y2}}{N} \quad (14)$$

Respecto a las ecuaciones anteriores (7-14), p_{iA} y p_{iB} son las prevalencias de infección en la población "A" y "B", respectivamente; $Se1$ y $Sp1$ son la sensibilidad y la especificidad de la prueba diagnóstica 1, respectivamente, y; $Se2$ y $Sp2$ son la sensibilidad y la especificidad de la prueba diagnóstica 2, respectivamente. Así, la primera ecuación (p_{a11}) representa la proporción de individuos de la población "A" con resultados positivos a ambas pruebas (o la probabilidad de obtener un resultado positivo a ambas pruebas en la población A), y es resultado de la suma de los verdaderos positivos que reaccionan simultáneamente a ambas pruebas (VP_{A1y2}) y los falsos positivos simultáneos a ambas pruebas (FP_{A1y2}). El resto de ecuaciones se compone también por tanto de sumas de verdaderos/falsos positivos y verdaderos/falsos negativos a cada una de las pruebas.

Las estimaciones ML pueden obtenerse a través de diferentes métodos frecuentistas, tales como la técnica de Newton-Raphson (Tanner, 1996) y el algoritmo de la "Maximización de la Esperanza" (*Expectation-Maximization*, EM) (Dempster et al., 1977). Estas aproximaciones no obstante se basan en el supuesto de un tamaño muestral grande, lo que garantizaría unos intervalos de confianza (IC) precisos (Johnson and Gastwirth, 1991; Johnson and Pearson, 1999; Johnson and Gastwirth, 2000; Johnson et al., 2001), y en la independencia entre los resultados a las dos pruebas, ambos supuestos no siempre fáciles de cumplir.

Posteriormente, Hui y Zhou (Hui and Zhou, 1998) investigaron nuevos métodos para la evaluación de pruebas diagnósticas sin la necesidad de trabajar bajo el supuesto anterior de independencia condicional entre los resultados de las dos pruebas diagnósticas a evaluar (incluyendo en el modelo un término que representara la correlación entre pruebas en animales infectados y no infectados).

La aproximación Bayesiana:

La metodología Bayesiana es una herramienta particularmente adecuada para la resolución de este problema (Lee, 1989; Gelman, 1995; Tanner, 1996; James Press, 2018).

La principal diferencia de la aproximación Bayesiana con la clásicamente empleada aproximación Frecuentista es que esta segunda evalúa métodos asumiendo un muestreo imaginario y repetitivo de un modelo en particular, lo que define la distribución de probabilidades correspondiente a los datos observados, condicionada por parámetros desconocidos pero fijos. En cambio, la aproximación Bayesiana asume que dichos parámetros no están definidos, sino que asume que tienen una distribución de probabilidad, motivo por el cual requiere de una distribución previa (*prior*) de todos los parámetros desconocidos del modelo. Los *priors* y las probabilidades (dados unos datos observados concretos) se emplean para el cálculo de la distribución posterior de los parámetros desconocidos y a través del muestreo repetitivo de esta distribución emergen todas las inferencias estadísticas (Carlin, 2009).

La estadística Bayesiana tiene su origen en el teorema de Bayes (Thomas Bayes, siglo XVIII), que, de manera simplificada, permite la incorporación de unos datos observados ("*likelihood* o probabilidad") a una hipótesis original ("*prior*", H) para la obtención de una estimación actualizada sobre la probabilidad de dicha hipótesis (Greenland, 1998; Malakoff, 1999) (Ecuación 15).

$$\Pr(H|Datos) = [\Pr(Datos|H) * \Pr(H)]/\Pr(Datos) \quad (15)$$

Así, la ecuación 15 expresa la probabilidad (Pr) de una hipótesis (H) dados unos datos observados en función de la probabilidad de los datos asumiendo dicha hipótesis, y la hipótesis, dividido entre la probabilidad de los datos (*marginal likelihood*).

Esta aproximación es particularmente adecuada para la evaluación de pruebas diagnósticas, ya que permite la incorporación de información científica previa (*prior*) sobre las sensibilidades y especificidades de las pruebas, al igual que sobre la prevalencia de las poblaciones muestreadas, para facilitar las estimaciones a partir de unos datos observados (Branscum et al., 2005). Los *priors* de los parámetros de interés se incorporan en este caso en forma de distribuciones de probabilidad que pueden formularse a partir de resultados obtenidos en estudios científicos anteriores e independientes del actual. Por tanto, el fruto del análisis Bayesiano serán distribuciones posteriores, resultado de la combinación de las distribuciones de los *priors* y los datos recogidos en el estudio. En las últimas dos décadas se han publicado numerosos estudios que demuestran metodológicamente la validez de esta aproximación en la evaluación de pruebas diagnósticas (Cowling et al., 1999; Enøe et al., 2000; Gardner, 2002; Su et al., 2004; Branscum et al., 2005; Berkvens et al., 2006; Collins and Huynh, 2014; Kostoulas et al., 2017) y, en concreto en ciencias veterinarias pueden encontrarse numerosos ejemplos de su aplicación (Enøe et al., 2000; Suess et al., 2002; Georgiadis Marios et al., 2003; Álvarez et al., 2012; Andritsos et al., 2012; Andritsos et al., 2013; Basso et al., 2013; Adel et al., 2015; Bermingham et al., 2015a; Buczinski et al., 2015; Chaka et al., 2015; Chapinal et al., 2015; Bauman et al., 2016; Ahasan et al., 2017; Dufour et al., 2017; Kostoulas et al., 2017).

A la hora de formular los *priors* para la incorporación de conocimientos previos en el estudio de fiabilidad de pruebas diagnósticos (así como en otros en los que la variable respuesta sea una proporción cuya función de probabilidad – *likelihood* – pueda expresarse como una distribución binomial) se suelen utilizar distribuciones beta, que al estar limitadas en el intervalo [0-1] resultan idóneas para expresar un conocimiento a priori sobre la sensibilidad, especificidad o prevalencia (por ser todas ellas proporciones) (Johnson and Gastwirth, 1991;

Joseph et al., 1995; Mendoza-Blanco et al., 1996; Bedrick et al., 1997; Álvarez et al., 2012). El procedimiento habitual para construir una distribución beta para un parámetro en particular implica la búsqueda bibliográfica de literatura relevante sobre el tema y/o la consulta con expertos con el fin de definir los valores más probables de este parámetro (θ_0) y unos límites inferior o superior (θ_L y θ_U) por encima/debajo de los cuales el investigador estará $(1-\gamma/2)$ seguro de que el parámetro de interés será superior e inferior, respectivamente. Por ejemplo, para un $\gamma=0,1$, el investigador estará 95% seguro que el parámetro de interés será superior a θ_L (percentil 5) o 95% seguro que el parámetro de interés será inferior a θ_U (percentil 95), con una moda igual a θ_0 . El proceso de estimación de una distribución beta a partir de θ_0 y θ_L/θ_U puede hallarse en (Enøe et al., 2000), si bien en la actualidad están disponibles programas informáticos que lo llevan a cabo como S-plus (Harrell, 2001), Betabuster (<http://www.vetmed.ucdavis.edu/cadms/diagnostic%20tests/software.cfm>), ParameterSolver (University of Texas MD Anderson Cancer Center) o el paquete estadístico PriorGen (Kostoulas, 2018) en R (RCoreTeam, 2017). Por ejemplo, para la construcción del *prior* de sensibilidad de la intradermotuberculinización en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, Álvarez y colaboradores (Álvarez et al., 2012) establecieron a partir de la bibliografía existente y la consulta con un panel de expertos que el valor más probable era 83,9% (moda) y que el percentil 5 estaba por encima del 60% (implicando que el 95% de la distribución estaría por encima de dicho valor), dando lugar a una distribución beta($a=8,5313542$; $b=1,8937188$) con la siguiente forma (Figura 5):

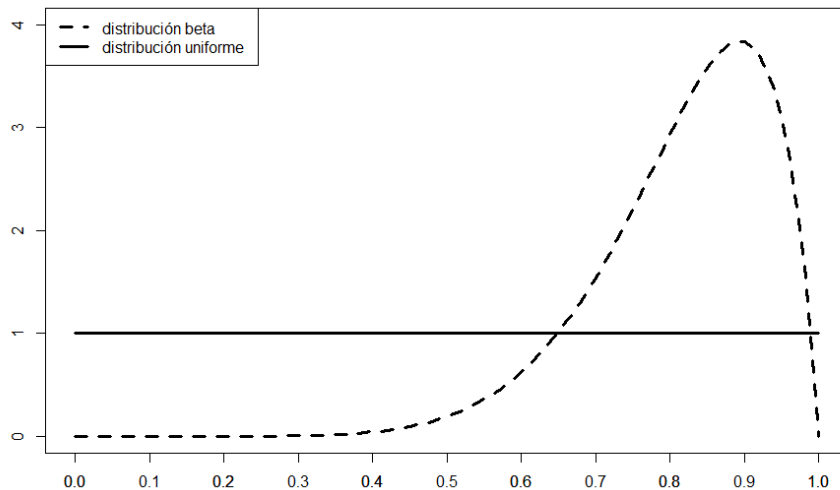


Figura 5. Distribución beta (moda= 83,9%; percentil 5= 60%) y distribución uniforme.

En situaciones en las que no existe información a priori disponible, o bien se quiere evitar cualquier tipo de influencia en la estimación de la distribución posterior, pueden utilizarse *priors* no informativos (o débilmente informativos) como la distribución uniforme (figura 5). Podrán emplearse *priors* no informativos en todos los parámetros del modelo siempre que éstos no superen en número a los grados de libertad (Branscum et al., 2005).

Tras la especificación de las distribuciones de los *priors* de cada uno de los parámetros desconocidos (la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas diagnósticas y la prevalencia de las dos poblaciones en estudio), éstos se combinan con la información derivada de los datos observados en campo para la estimación conjunta de las distribuciones posteriores (probabilidades condicionales dados unos datos concretos). Si la distribución posterior se concentra especialmente en torno a un valor concreto indicaría una mayor probabilidad alrededor de dicho valor. Normalmente la mediana de la distribución posterior se emplea para resumir la distribución en un solo punto, mientras que la desviación estándar es un indicador de la precisión de esa estimación. Finalmente se obtienen los intervalos de probabilidad (1-alfa) que contienen un porcentaje 1-alfa de la distribución (de modo que un alfa=0,05 daría lugar al intervalo que, con un 95% de probabilidad, contiene el

parámetro de interés (Enøe et al., 2000); por ello se denomina “intervalo de probabilidad” en lugar de “intervalo de confianza”, ya que la primera denominación es más descriptiva y está más estrechamente relacionada con la interpretación de este intervalo (Branscum et al., 2005).

Las estimaciones de las distribuciones posteriores se pueden llevar a cabo mediante simulaciones de Monte-Carlo, basadas en el empleo de una o varias cadenas que contienen los valores simulados denominadas cadenas Markov, dado que cada valor solo es dependiente del valor inmediatamente anterior (Figura 6). Las simulaciones se repiten tantas veces (iteraciones) como sea necesario hasta alcanzar la convergencia; existe convergencia cuando las cadenas Markov están próximas entre sí, indicando acuerdo estable entre las estimaciones de las diferentes cadenas. Debido a que la simulación debe empezar en algún valor del espacio muestral de cada parámetro a estimar, y que dicho valor inicial puede ejercer una influencia sobre las estimaciones posteriores durante un número limitado de simulaciones, los resultados de las primeras simulaciones obtenidos se desechan (periodo *burn-in*) (Johnson et al., 2001; Gardner, 2002). Esta convergencia también puede evaluarse mediante el estadístico de Gelman-Rubin (Gelman and Rubin, 1992) que compara la varianza estimada entre cadenas y la varianza estimada dentro de cada cadena. Se asume que valores inferiores a 1,1 son indicativos de una convergencia adecuada de las cadenas.

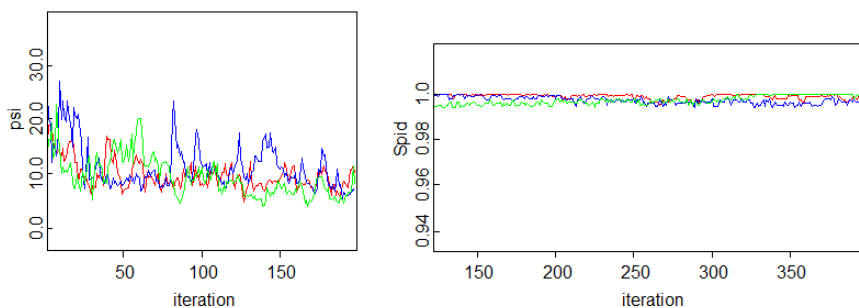


Figura 6. Visualización de las cadenas Markov (verde, roja y azul) empleadas en la simulación de dos parámetros; cadenas no convergentes en psi (izquierda), cadenas convergentes en Spid (derecha).

Las cadenas pueden muestrearse para la construcción de los intervalos de probabilidad utilizando distintas técnicas, siendo la técnica de muestreo de Gibbs una de las más utilizadas (Gelfand and Adrian, 1990; Gelman, 1995; Andersen, 1997). En conclusión, el proceso de simulación genera muchos valores y un gráfico de estos valores puede considerarse una aproximación numérica de la correspondiente densidad de probabilidad (Figura 7) (Enøe et al., 2000).

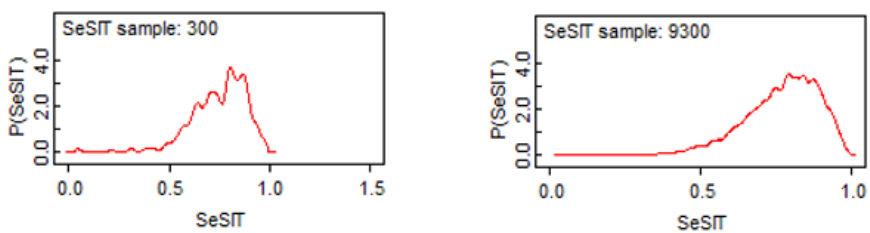


Figura 7. Gráficos de densidad de probabilidad de las estimaciones posteriores tras 300 iteraciones y 9300 iteraciones, respectivamente, en los que se aprecia una distribución de probabilidad más definida y armónica en el segundo caso

En ciertas ocasiones puede observarse autocorrelación entre muestras de la distribución posterior obtenidas en iteraciones consecutivas (Carlin, 2009), lo que limitaría el número real de muestras independientes válidas para la estimación de dicha distribución. Para evitar este fenómeno se suele aplicar un proceso de “adelgazamiento” (*thinning*), consistente en almacenar solo una muestra de cada X iteraciones, de modo que el número real de muestras utilizadas en la estimación sería $Y \cdot N / X$ (siendo N el número total de iteraciones contenidas en cada cadena asumiendo Y cadenas).

A pesar de sus ventajas la aproximación Bayesiana despierta también muchas críticas, especialmente en lo que al uso de información subjetiva a priori respecta (lo que otros consideran una de sus grandes fortalezas) (Gardner, 2002; Carlin, 2009). Si esta información previa o *prior* está sesgada y se le da un peso excesivo (traducido en una distribución del *prior* muy acotada) de manera no justificada las estimaciones posteriores pueden ser erróneas. Por ello, un paso crítico en el análisis Bayesiano es el análisis de sensibilidad, en el

que se evalúa el efecto de los *priors* (su influencia) en el resultado final. Este análisis de sensibilidad conlleva la sustitución de los *priors* por otras distribuciones (Gardner, 2002) o por distribuciones no informativas (Enøe et al., 2000). Si tras esta sustitución se observara un cambio drástico de las correspondientes estimaciones posteriores implicaría una influencia del *prior* en el resultado, lo que debe ser reportado y analizado convenientemente.

Si bien la estadística Bayesiana puede utilizarse para el ejemplo de dos pruebas independientes y dos poblaciones, pueden formularse modelos para la estimación de la fiabilidad de pruebas diagnósticas cuyos resultados no sean independientes, o en el caso de una o múltiples poblaciones (Branscum et al., 2005) y bajo diferentes tipos de muestreo. A continuación, se desarrollan algunos de los aspectos a valorar en este tipo de estudios.

La combinación de pruebas diagnósticas se emplea en muchos programas de vigilancia y control de enfermedades del ganado. Cuando estas pruebas analizan un fenómeno biológico similar como, por ejemplo, en caso de que ambas estén basadas en la detección de un mismo mecanismo (véase, una citoquina en concreto), es esperable que los resultados en un determinado animal estén correlacionados (Gardner et al., 2000). La dependencia condicional de las sensibilidades de las pruebas ocurre cuando la probabilidad de que una prueba detecte correctamente un animal infectado está relacionada con la probabilidad de que la segunda prueba lo haga (es decir, las probabilidades de detección de un animal por cada una de las pruebas no son independientes). De igual manera ocurriría con la especificidad, aunque una dependencia de las sensibilidades no implica necesariamente una dependencia de las especificidades y viceversa. Este aspecto es muy importante y en caso de que haya una dependencia condicional entre las pruebas diagnósticas, ésta deberá ser contemplada en el modelo (Gardner et al., 2000; Dendukuri and Joseph, 2001; Georgiadis Marios et al., 2003; Kostoulas et al., 2017) mediante la introducción de dos nuevos parámetros: la covarianza entre los resultados de las pruebas en individuos infectados (cov_{D+}) y la covarianza entre los resultados de las pruebas en individuos no infectados (cov_{D-}) que, en un escenario donde se

aplican dos pruebas diagnósticas en una sola población, se traduciría a $cov_{D+} = Se_{11} - Se_1 * Se_2$, y $cov_{D-} = Sp_{22} - Sp_1 * Sp_2$ (Dendukuri and Joseph, 2001); siendo Se_{11} la proporción de individuos infectados que son positivos a ambas pruebas, Se_1 la proporción de infectados positivos la prueba 1 (independientemente del resultado en la prueba 2), Se_2 la proporción de infectados positivos a la prueba 2, Sp_{22} la proporción de individuos no infectados que son negativos a ambas pruebas, Sp_1 la proporción de no infectados negativos a la prueba 1 y Sp_2 la proporción de no infectados negativos a la prueba 2. Las ecuaciones a continuación (16-19) conforman el modelo correspondiente al escenario anterior con los términos de covarianza incluidos (Branscum et al., 2005):

$$p_{11} = pi * (Se1 * Se2 + cov_{D+}) + (1 - pi) * [(1 - Sp1) * (1 - Sp2) + cov_{D-}] \quad (16)$$

$$p_{12} = pi * [Se1 * (1 - Se2) - cov_{D+}] + (1 - pi) * [(1 - Sp1) * Sp2 - cov_{D-}] \quad (17)$$

$$p_{21} = pi * [(1 - Se1) * Se2 - cov_{D+}] + (1 - pi) * [Sp1 * (1 - Sp2) - cov_{D-}] \quad (18)$$

$$p_{22} = pi * [(1 - Se1) * (1 - Se2) + cov_{D+}] + (1 - pi) * (Sp1 * Sp2 + cov_{D-}) \quad (19)$$

Generalmente, el grado de correlación entre dos pruebas diagnósticas basadas en un mismo principio (y cuya dependencia por tanto se sospeche) se desconoce, y es por ello que normalmente se emplean distribuciones uniformes (no informativas o débilmente informativas) como *priors* de estos parámetros (Branscum et al., 2004); es tras el análisis bayesiano, con las estimaciones posteriores de ambos términos de correlación, cuando se confirma si la dependencia entre ambas pruebas es estadísticamente importante (usando normalmente el criterio de si el intervalo posterior de probabilidad engloba el valor cero) o no.

Otro aspecto importante en este tipo de estudios es la elección de la población diana. Independientemente de que se realice el estudio en una o múltiples poblaciones, los criterios de elegibilidad de las mismas deben establecerse y justificarse de antemano (Kostoulas et al., 2017). Posteriormente, n_k individuos son seleccionados aleatoriamente de cada población k (Branscum et al., 2005) y, en general, se asume que dicho muestreo es

multinomial, es decir, que el tamaño de la muestra es menor que el censo de cada una de las poblaciones ($n_k < N_k$). Sin embargo, también es posible que se muestree el censo por completo de cada población ($n_k = N_k$), de modo que la probabilidad de seleccionar un individuo cualquiera sigue una distribución hipergeométrica (Su et al., 2004). El modelo y el procesamiento de los datos, así como la estimación de las distribuciones posteriores, difieren en función del tipo de muestreo.

Actualmente, partiendo de la guía STARD (Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies) se ha generado la guía STARD-BLCM (Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies that use Bayesian Latent Class Models), adaptada específicamente para la comunicación de estudios sobre fiabilidad diagnóstica de pruebas estimada mediante la aplicación de una aproximación Bayesiana (Kostoulas et al., 2017). Estas guías, al igual que las equivalentes para la comunicación de resultados de estudios experimentales u observacionales (Elm et al., 2007; Kilkenney et al., 2010), tienen como objetivo fomentar la circulación de información completa y transparente sobre este tipo de estudios, especialmente en lo que a diseño, desarrollo y resultados se refiere, para facilitar su reproducción y también evitar inferencias sesgadas.

Software:

Uno de los métodos más habituales para la estimación de la distribución posterior es el denominado muestreo de Gibbs (Gelfand and Adrian, 1990; Joseph et al., 1995; Mendoza-Blanco et al., 1996; Tanner, 1996; Johnson et al., 2001) que puede ser implementado a través de diferentes programas informáticos como WinBUGS (Lunn et al., 2000), OpenBUGS (Lunn et al., 2009), JAGS (Plummer, 2012), R (RCoreTeam, 2017), S-plus (Harrell, 2001) y SAS (SAS Institute, Cary NC). En ellos, el investigador únicamente necesita especificar la función de probabilidad, el *likelihood* (es decir, los datos recogidos en campo) y las distribuciones de los *priors* y, a través del programa, pueden estimarse las distribuciones posteriores de los parámetros del modelo. En función del tipo de distribución que muestran estas estimaciones posteriores existen varias posibilidades de muestreo: si la distribución pertenece a una familia

reconocible de distribuciones, se muestrea directamente sin necesidad de transformación; si lo anterior no se cumple, se recurre al método de muestreo por rechazo adaptativo (Gilks and Wild, 1992) o al algoritmo Metropolis (Robert, 1999).

Además de los programas anteriores, R (RCoreTeam, 2017) ha incorporado recientemente paquetes estadísticos como R2OpenBUGS (Sturtz, 2010), R2WinBUGS (Gelman et al., 2005), R2jags (Su, 2015), rjags (Plummer, 2016), que permiten comunicarse con estos *Gibbs samplers*.

3.1.2.2. Epidemiología espacial

Las enfermedades infecciosas exhiben clásicamente un patrón de agrupación espacio-temporal, de modo que los casos se presentan en momentos y lugares cercanos entre sí debido a la naturaleza contagiosa de la enfermedad (Selvin, 1991). En el caso de enfermedades no infecciosas la proximidad a posibles factores de riesgo ambientales también es importante, dando lugar con frecuencia a similares patrones (Pfeiffer, 2008). En este contexto, los objetivos del análisis epidemiológico espacial son la visualización y descripción de los patrones espaciales, la identificación de agrupamientos de casos de enfermedad o *clusters* indicativos de un mayor riesgo, y el uso de esta información para la explicación o predicción de riesgos para la salud (Ward and Carpenter, 2000a; Stevens and Pfeiffer, 2011). Aunque las técnicas de análisis espacial han sido útiles en la investigación del origen de brotes de etiología conocida, también tienen su aplicación en la investigación de enfermedades de etiología desconocida (como la leucemia infantil (Turnbull et al., 1990)) y en el estudio del efecto de ciertos factores medioambientales como la contaminación sobre la salud (Lilienfeld, 1980). De hecho, se considera tradicionalmente la investigación de Snow del brote de cólera acontecido en Londres en 1854, previo a la identificación del agente etiológico de la enfermedad, como el primer ejemplo documentado de la aplicación de esta metodología (Pfeiffer, 2002). Pero la utilidad de la epidemiología espacial no está limitada únicamente al estudio de enfermedades: en el terreno de la veterinaria pueden emplearse también

para generar y evaluar hipótesis sobre las posibles causas de una producción subóptima (Ward and Carpenter, 2000a).

La evolución de la epidemiología espacial aplicada a la medicina humana y veterinaria ha ido de la mano del aumento de la interconectividad global como resultado del desarrollo económico global. Al igual que las oportunidades de emergencia y/o dispersión de enfermedades aumentaban, también lo hacía la cantidad de datos generados. Y gracias a la revolución digital de los últimos 30 años ha tenido lugar la emergencia de métodos electrónicos de medida, registro, almacenamiento y distribución de la información, además de convertirse Internet en la columna vertebral de la red de información de alcance global (Pfeiffer and Stevens, 2015). Esta información masiva, denominada en inglés *Big Data*, es compleja y de calidad variable, por lo que, aparte del desarrollo de una infraestructura tecnológica y de comunicación, ha sido necesario el desarrollo de herramientas de manejo de los datos para que sean accesibles para su análisis (Mayer-Schönberger, 2014), entre las que figuran los sistemas de información geográfica.

En producción animal, el uso del *Big Data* tiene un importante potencial para contribuir a la mejora de la sanidad, producción y bienestar animal. Un progreso importante logrado en las últimas décadas consiste en el desarrollo y uso de herramientas para monitorizar y recoger información de manera rutinaria de animales y explotaciones (Rutten et al., 2013; Mortari and Lorenzelli, 2014; Morota et al., 2018), entre las que se encuentra el uso de sensores, imágenes digitales e información de sonido. Por ejemplo, para la monitorización de casos de mastitis en granjas de producción de leche, se puede recoger información sobre la cantidad de leche producida, su conductividad o su lactato deshidrogenasa a lo largo del tiempo (Wang, 2005) mediante sensores en las máquinas de ordeño automático, para junto con los resultados de las pruebas laboratoriales determinar la incidencia de mastitis y establecer una intervención temprana (Sun et al., 2010). Otro ejemplo sería la utilización del escaneo de imágenes para determinar el peso de los animales de producción, indicador del manejo de la crianza y la nutrición en una

explotación, de manera que se puedan medir automáticamente las dimensiones de la imagen de un animal y se establezca su relación con su peso mediante ecuaciones (Kongsro, 2014; Gomes et al., 2016); o los sistemas de identificación y localización del ganado en tiempo real (Pfeiffer and Stevens, 2015; Stevens and Pfeiffer, 2015).

Los sistemas de información geográfica también desarrollados en el marco de esta era del *Big Data* han facilitado la creación y desarrollo de almacenes de información georreferenciada específica de sanidad animal y de enfermedades a nivel global. Entre los almacenes más importantes se encuentran el *Disease BioPortal*, que permite el acceso a información en tiempo real (o casi) sobre hasta 40 enfermedades animales a nivel local, regional o global (<http://bioportal.ucdavis.edu>) (Perez et al., 2011a), el *EMPRES Global Animal Disease Information System*, que proporciona información actualizada sobre la distribución global de enfermedades animales, así como sobre riesgos a nivel nacional, regional y global, representados en mapas (<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/home.asp>) (Martin et al., 2007c; Farnsworth et al., 2010), el *EMPRES-i genetic module*, módulo que combina información epidemiológica de brotes con la caracterización genética de virus influenza (OpenFluDB) (Claes et al., 2014), el *FAO GeoNetwork*, que permite el acceso a mapas interactivos y descargables e imágenes de satélites con sus correspondientes bases de datos con información espacial (<http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/main.home>), el *Global Livestock Production and Health Atlas*, atlas electrónico e interactivo que contiene estadísticas globales sobre producción y sanidad animal, y que también permite la visualización cartográfica de estadísticas sobre el sector ganadero a nivel nacional (http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/aga_in_action/glip_ha.html) (Clements et al., 2002; Franceschini et al., 2009), y la *World Animal Health Information Database*, que permite el acceso al sistema de información global sobre sanidad animal de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), que además de incluir información sobre la distribución global de enfermedades y mapas de brotes, contiene información sobre brotes excepcionales a nivel nacional, así como los mapas con las medidas de prevención y control establecidas

(http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home) (Jebara et al., 2012).

Para la realización de investigaciones sobre la distribución espacial de una enfermedad el primer paso a seguir consiste en la visualización de la información de interés (normalmente, la distribución de casos de una enfermedad en el espacio). A partir de dicha visualización se pueden formular hipótesis sobre la presencia de agrupaciones “significativas” de casos en el espacio y de factores que puedan condicionar la distribución de la enfermedad, hipótesis que pueden ser evaluadas mediante la aplicación de técnicas de análisis estadístico. En último lugar, y en función de la información disponible, pueden formularse modelos que permitan explicar e incluso predecir la distribución de dichos casos (Figura 8).

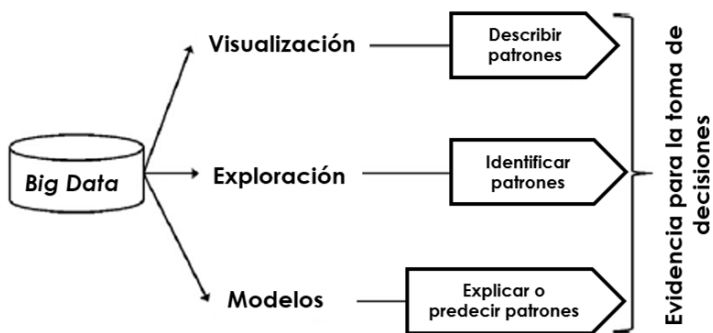


Figura 8. Proceso de análisis espacial de la información para facilitar la toma de decisiones en el ámbito de la sanidad animal (adaptado de Pfeiffer and Stevens, 2015).

Visualización de patrones espaciales:

Mediante la visualización de la distribución espacial de un fenómeno se puede identificar rápidamente un patrón espacial obvio y comunicar de manera eficiente la información relativa a una enfermedad desde una perspectiva geográfica. Para ello se emplean los sistemas de información geográfica (*Geographic Information Systems, GIS*), los cuales permiten la captura, almacenamiento informatizado, manipulación, análisis, proyección y

comunicación de datos georreferenciados (Sanson et al., 1991). Son especialmente útiles en el ámbito de la sanidad animal debido a su capacidad de almacenar información relativa a factores demográficos y causales y también de incidencia de enfermedad en un contexto geográfico, además de incluir normalmente un número variable de funciones de análisis espacial.

Estos sistemas GIS integran tecnología de visualización informatizada y sistemas de manejo de bases de datos. La información geográfica se organiza en forma de diferentes capas que constituyen los mapas temáticos, junto a los atributos que los caracterizan. Estos atributos son los elementos relacionados con las distintas capas pero que no necesariamente forman parte del mapa (por ejemplo, el nombre de los municipios).

La información almacenada en los GIS deriva, generalmente, de la digitalización de la información contenida en mapas existentes o de la captura directa de datos remotos, como fotografías aéreas e imágenes de satélites. Otra opción empleada en estudios ecológicos es la captura en tiempo real de coordenadas mediante el uso de telemetría, por ejemplo, fijando transmisores a los animales en estudio.

Los mapas digitales se almacenan normalmente en GIS en dos formatos básicos: el primero basado en cuadrículas (o ráster) y el segundo en vectores (Sanson et al., 1991). En los sistemas con formato ráster, la información espacial se agrega superponiendo una cuadrícula sobre el área de interés; el usuario puede especificar la dimensión del patrón de la cuadrícula (Figura 9). La información sobre los atributos puede asociarse bien a celdas individuales o a grupos de celdas que son homogéneas entre sí en referencia a una característica, de modo que cada celda tiene normalmente un único valor de la característica de interés; estos sistemas son prácticos para el almacenamiento y manipulación de características geográficas a nivel regional cuyos valores son teóricamente medibles en todos los puntos del espacio (por ejemplo, la altitud). En los sistemas basados en vectores, en cambio, los elementos geográficos se representan como puntos, líneas o

polígonos (Figura 9). Los puntos corresponden a localizaciones únicas, definidos por coordenadas concretas; las líneas están compuestas por segmentos lineales y los polígonos son áreas únicas delimitadas por líneas.

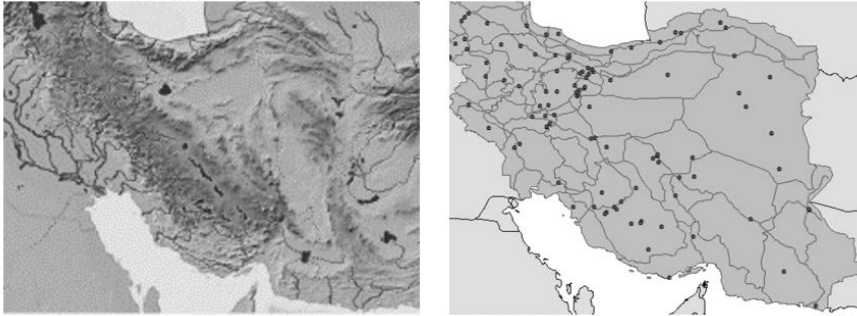


Figura 9. Mapa con formato ráster (izquierda) y mapa con formato basado en vectores (derecha).

Exploración de la información espacial:

El análisis exploratorio de datos espaciales se basa en el empleo de métodos estadísticos para evaluar las hipótesis generadas a partir de la visualización de los datos, es decir, permite determinar la probabilidad de que el patrón espacial observado sea resultado de una variación no aleatoria. Estos métodos consisten generalmente en la detección de áreas de riesgo a partir de la identificación de agrupamientos de casos o *clusters* (Pfeiffer and Stevens, 2015). La metodología del escaneo espacial ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años con el fin de poderse aplicar a una gran variedad de estructuras espaciales y a un amplio rango de variables con diferentes escalas de medida (Correa Thais et al., 2014; Costa and Kulldorff, 2014; Murray et al., 2014; Prates Marcos et al., 2014).

El término de agrupación espacial o *clustering* se emplea para describir la agregación espacial de enfermedad, pero como el patrón espacial observado puede deberse simplemente a la distribución de la población en riesgo o de diferentes factores de riesgo, una definición más acertada sería

“una variación espacial residual del riesgo después de que todos posibles condicionantes hayan sido tenidos en cuenta” (Elliott, 2000).

Previo al análisis espacial es imprescindible conocer los conceptos relativos a la heterogeneidad y dependencia espacial. Un principio básico de dependencia espacial, según enuncia la Primera ley de Tobler de geografía, es que “Todas las cosas están relacionadas entre sí, pero las cosas más próximas en el espacio tienen una relación mayor que las distantes” (Tobler, 1970). Esto significa que los valores de atributos medidos en localizaciones cercanas entre sí tienden a ser más similares que aquellos procedentes de localizaciones distantes, por lo que la proximidad espacial por sí sola representa una forma de *clustering* (como ocurre en vacas agrupadas en una explotación o estudiantes agrupados en una escuela) (Pfeiffer, 2008). Si esta dependencia no varía en toda el área en estudio, es decir, si es la misma en cualquier localización en una cierta área geográfica, el proceso espacial es calificado como estacionario. Sin embargo, si la estructura de correlación espacial varía a lo largo del área de estudio, el proceso se califica como heterogéneo. Si esta dependencia espacial en un proceso estacionario está únicamente afectada por la distancia y no por la dirección, entonces se denomina un proceso isotrópico, mientras que si la dependencia es diferente en función de la dirección se denomina anisotrópico (Pfeiffer, 2008).

Los métodos de análisis exploratorio de la información espacial pueden clasificarse en métodos locales y métodos globales. Los métodos de detección de agrupamiento global se emplean para evaluar si existe una agregación de enfermedad a lo largo del área de estudio, pero no determina la localización específica de los *clusters*. Estos métodos aportan un único estadístico que mide el nivel de agrupación espacial, para posteriormente determinar su significación estadística. Este estadístico es fruto de la comparación de la distribución observada en los datos con la distribución esperada según la hipótesis nula de ausencia de agrupación espacial, es decir, según el supuesto de aleatoriedad espacial absoluta (*complete spatial randomness*) (Pfeiffer, 2008). En el caso de una distribución de casos de enfermedad en el espacio, la aleatoriedad espacial absoluta correspondería

a una distribución de Poisson homogénea en el espacio (Stoyan, 1986; C. Bailey and Gatrell, 1995; Tanimura and Shima, 2011).

Los métodos de detección de agrupamiento local en cambio tienen como objetivo la identificación de la localización y extensión de los *clusters*, y pueden subdividirse en métodos focalizados y no-focalizados. Los métodos no-focalizados identifican la localización de todos los *clusters* potenciales en un área de estudio mientras que los métodos focalizados investigan si existe un riesgo de enfermedad incrementado alrededor de un punto pre-determinado (por ejemplo, alrededor de una planta nuclear) (Pfeiffer, 2008).

La elección de un método u otro está condicionada por la hipótesis a evaluar, pero también lo está por la estructura de los datos, pudiendo éstos ser individuales o agregados (Figura 10). Los datos son de carácter individual cuando existe una única observación por localización geográfica (por ejemplo, presencia o ausencia de enfermedad en una granja), y generalmente están representados por puntos. Los datos están agregados cuando se resume el conjunto de datos de un grupo de individuos en un único valor para producir, por ejemplo, una frecuencia total, una media, una mediana o una proporción (por ejemplo, prevalencia en una granja). A continuación, este estadístico descriptivo se asigna a una localización espacial, generalmente un área discreta, como un municipio, una provincia, una comunidad autónoma u otro tipo de región administrativa (Pfeiffer, 2008). No obstante, es posible transformar los datos agregados a individuales y viceversa, como puede apreciarse en la investigación de Pérez y colaboradores de la dinámica espacial de la tuberculosis bovina en Argentina, quienes emplearon tanto datos individuales como agregados a nivel de municipio (Perez et al., 2002b).



Figura 10. Representación en un mapa de la distribución de explotaciones positivas a tuberculosis bovina (izquierda) y de la prevalencia de enfermedad a nivel de municipio (derecha) (adaptado de Pfeiffer, 2008).

Métodos de detección de agrupamiento global:

A continuación, se describen algunos de los métodos de detección de agrupamiento global más ampliamente utilizados en el campo de la sanidad animal que han sido aplicados en esta tesis doctoral. Cabe destacar que estos métodos se rigen por las distancias entre pares de localizaciones, especialmente, por la distancia entre pares de localizaciones más próximas entre sí (Clark and Evans, 1955; Lewis, 1980; Cuzick and Edwards, 1990), lo que se conoce en epidemiología espacial como vecindad. Estas relaciones de “vecinos más cercanos” en el espacio pueden ser recíprocas o no recíprocas. Un punto puede ser el vecino más cercano de su vecino más cercano o

puede que este vecino más cercano esté más cerca a otro punto, como se refleja en la Figura 11.

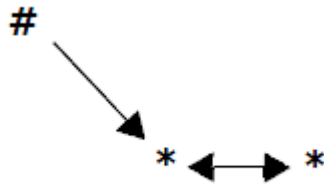


Figura 11. Representación de la relación entre “vecinos más cercanos”; los asteriscos son los más cercanos entre sí (relación recíproca) mientras que la relación entre almohadilla y su vecino más cercano no es recíproca.

Un punto tiene un vecino más cercano, pero esta relación puede considerarse a niveles superiores de vecindad (segundo vecino más cercano, tercero, cuarto, etc.); el término k define el número de vecinos o niveles de vecindad a tener en cuenta en el análisis espacial (Figura 12).

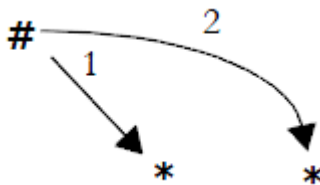


Figura 12. Niveles de vecindad; la almohadilla tiene a los asteriscos como primer ($k= 1$) y segundo vecino más cercano ($k= 2$), respectivamente.

El test de Cuzick & Edwards (Cuzick and Edwards, 1990) es una prueba apta para el análisis de datos individuales que evalúa las relaciones entre individuos con sus vecinos más cercanos para determinar si existe una agrupación de casos (observaciones positivas) con respecto a los controles (observaciones negativas). La hipótesis a evaluar en este caso sería la de que los casos tienden a tener otros casos como vecinos más cercanos, siendo lo contrario cierto para los controles. Mediante este test, el número de pares de observaciones a un nivel k de vecindad clasificadas como casos son comparadas con las esperadas según la hipótesis nula de que todos los casos se distribuyen

aleatoriamente en el espacio. La ecuación a continuación refleja el cálculo del número de casos en la base de datos cuyos vecinos son también casos a un nivel de vecindad k .

$$T_k = \sum_{i=1}^N \delta_i d_i^k \quad (20)$$

Siendo N el tamaño de la población en estudio, δ_i equivale a 1 si la observación i es un caso y a 0 si ésta es un control, d_i^k equivale a 1 si el vecino más cercano a i en un nivel k de vecindad es un caso y a 0 si éste es un control. Según la hipótesis nula, el valor esperado del T_k sería:

$$E(T_k) = pkN; \quad p = \frac{N_o}{N} \left(\frac{N_o - 1}{N - 1} \right) \quad (21, 22)$$

La significación de este estadístico puede evaluarse mediante un test z , que calcula la diferencia estandarizada entre los valores del T_k observado y del $E(T_k)$ esperado dividido por la desviación estándar (Ecuación 23):

$$z = \frac{T_k - E(T_k)}{\sqrt{Var(T_k)}} \quad (23)$$

No obstante, también se puede evaluar la significación de este estadístico comparando los valores observados para cada k con aquellos generados bajo la hipótesis nula mediante simulaciones de Monte Carlo.

Un ejemplo de su aplicación puede encontrarse en la investigación llevada a cabo por Pérez y colaboradores (Perez et al., 2002b) sobre los patrones espaciales de la tuberculosis bovina (bTB) a nivel de municipio en Argentina. En este estudio, los municipios con una prevalencia superior a la media nacional fueron definidos como casos y aquellos con una prevalencia menor o igual, como controles. El posible agrupamiento espacial de enfermedad fue evaluado en niveles de vecindad de 1 a 10, observándose un *clustering* significativo de los municipios "caso" en los niveles primero y segundo de vecindad ($k=1$ y $k=2$, respectivamente), lo que sugiere que el *clustering* de bTB en Argentina se produce a una escala espacial relativamente pequeña, de

modo que los municipios “caso” tienden a estar rodeados por otros municipios “caso” hasta el segundo nivel de vecindad. Por otro lado, en un estudio reciente llevado a cabo en nuestro país, los autores concluyeron utilizando esta prueba que la distribución de *Coxiella burnetii* en explotaciones de vacuno de la Comunidad de Madrid presentaba una dependencia espacial significativa en el primer nivel de vecindad, lo que sugería que las granjas más cercanas podrían servir de fuente de infección para otras granjas (Alvarez et al., 2012b).

El estadístico I de Moran (Moran, 1950) es un coeficiente ponderado de correlación empleado en la estimación del grado de similitud espacial observado entre localizaciones vecinas en lo que a los valores de un atributo respecta. Fundamental para su cálculo es la matriz de ponderaciones que define las relaciones espaciales entre localizaciones, de manera que se da un peso mayor a aquellas que están más cerca en el espacio que a aquellas que están más distantes. Los vecinos se definirán por tanto en función de la distancia entre ellos o su colindancia (Pfeiffer, 2008); se considera que existe colindancia entre polígonos (áreas) si éstos tienen en común una fracción o al menos un punto de sus límites geográficos. En caso de que se emplee la distancia, ésta se medirá entre los puntos o, en el caso de polígonos, normalmente entre sus centroides.

El cálculo del coeficiente *I* de Moran guarda similitud con el coeficiente de correlación de Pearson, estando sus valores normalmente limitados al intervalo [-1,1] (Ecuación 24).

$$I = \frac{n \sum_i \sum_j W_{ij} (Z_i - \bar{Z})(Z_j - \bar{Z})}{(\sum_i \sum_j W_{ij, i \neq j}) \sum_i (Z_i - \bar{Z})^2} \quad (24)$$

Donde Z_i y Z_j corresponden a los valores observados en las localizaciones i y j , \bar{Z} es la media del conjunto de valores del área de estudio y W_{ij} es la matriz de ponderación que tiene en cuenta la cercanía entre las localizaciones i y j (Figura 13).

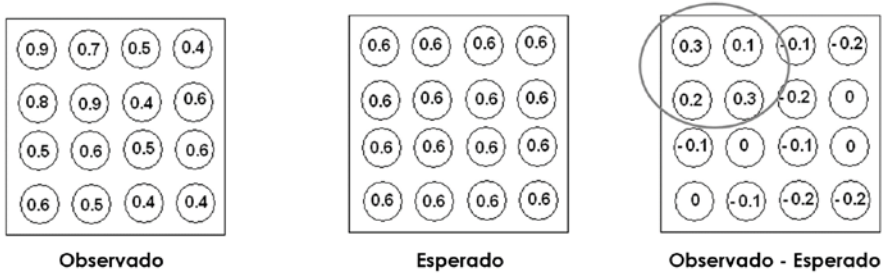


Figura 13. Estimación del grado de similitud espacial de las prevalencias registradas en los diferentes municipios de una provincia; el “Esperado” corresponde a \square y el cálculo del coeficiente I de Moran se lleva a cabo utilizando los valores de la tercera imagen (“Observado - Esperado”).

Un coeficiente I de Moran próximo a cero indica ausencia de *clustering* (no se puede rechazar la hipótesis nula); un coeficiente positivo y cercano a 1 indica la existencia de autocorrelación espacial positiva, es decir, *clustering* de áreas con valores similares de un determinado atributo (por ejemplo, riesgo de enfermedad); y un coeficiente negativo y próximo a -1 indica la existencia de autocorrelación espacial negativa, es decir, áreas vecinas tienen a presentar valores muy dispares de un determinado atributo (Moran, 1950). La significación del estadístico se evalúa mediante un test z , que calcula la diferencia estandarizada entre los valores del I observado y del $E(I)$ esperado dividido por la desviación estándar (ecuación 25):

$$Z_N = \frac{I - E(I)}{\sqrt{Var_N(I)}} \quad (25)$$

Siendo el esperado:

$$E(I) = -\frac{1}{(N-1)} \quad (26)$$

También se puede evaluar la significación de este coeficiente comparando el I observado con la distribución de valores generados bajo la hipótesis nula mediante simulaciones de Monte Carlo.

El coeficiente I de Moran se emplea en la determinación de la Autocorrelación Espacial Incremental (*Incremental Spatial Autocorrelation, ISA*), que mide el grado de correlación presente entre localizaciones vecinas utilizando una serie de bandas de distancia en aumento en la identificación de localizaciones vecinas para identificar la intensidad de la autocorrelación a distintas escalas espaciales, lo que permite determinar a qué distancia esta intensidad es mayor (Figura 14).

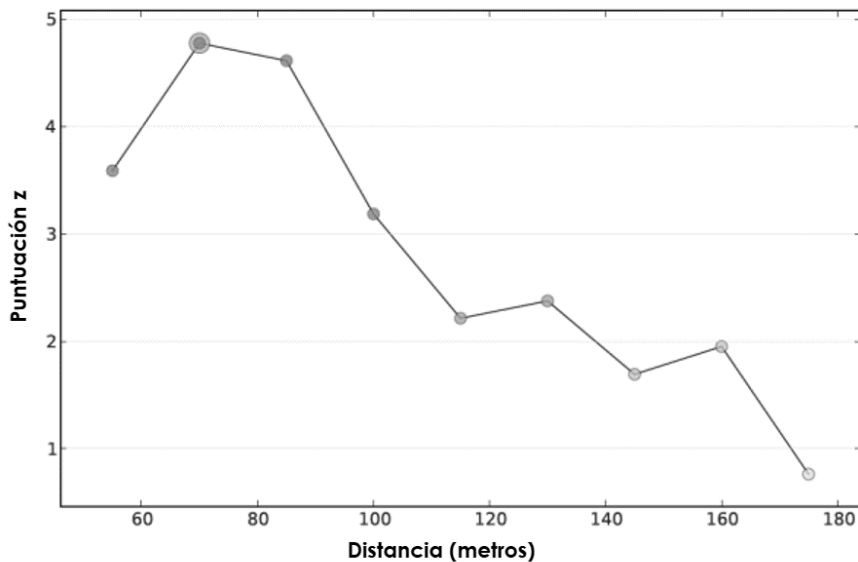


Figura 14. ISA de la prevalencia de granjas localizadas en el área de estudio; el pico de puntuación z refleja la distancia donde la autocorrelación espacial de la prevalencia es superior.

El investigador Castresana (Castresana, 2002) empleó el estadístico I de Moran para caracterizar el patrón de localización de mutaciones en cromosomas humanos y de ratones, encontrando que los genes humanos con alto contenido en GC habían experimentado las mayores divergencias en relación con los genes de ratón. Otro de los numerosos ejemplos que podemos encontrar en la literatura científica sobre su aplicación es un estudio epidemiológico de la brucelosis en rumiantes en las provincias del norte de

Egipto, donde se evaluó la posible autocorrelación espacial de la prevalencia de granjas seropositivas y animales seropositivos por distrito, constatando la existencia de *clustering* en la segunda (coeficiente= 0,58; $p < 0,001$) pero no en la primera (coeficiente= -0,013; $p = 0,445$) (Hegazy et al., 2011).

Los métodos a continuación, también dirigidos a la detección de agrupamiento global, emplean únicamente la información individual de los casos, a diferencia de los métodos anteriormente descritos donde casos y controles eran tenidos en cuenta.

El estadístico de Knox (Knox, 1963; Knox and Bartlett, 1964), diseñado para la detección de agrupamiento global espacio-temporal de los casos, se basa en la hipótesis alternativa de que los pares de casos cercanos en el espacio tienden a estar cercanos en el tiempo también. Para su cálculo se contabilizan los pares de casos próximos entre sí en el tiempo y el espacio en base a una distancia y a un período críticos o umbrales establecidos de antemano mediante la ecuación a continuación:

$$X = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{i-1} s_{ij} t_{ij} \quad (27)$$

Siendo N el número de casos, s_{ij} el valor de la colindancia espacial (que será igual a 1 si la distancia entre los casos i y j es menor que la distancia crítica preestablecida o igual 0 si es mayor o igual) y t_{ij} el valor de la colindancia temporal (que será igual a 1 si el período entre la aparición de los casos i y j es menor que el período crítico preestablecido o igual 0 si es mayor o igual). Mediante la prueba de Chi-cuadrado se calculan las diferentes probabilidades de clasificación de los eventos (próximos en espacio-tiempo; próximos en el espacio, pero lejanos en el tiempo; lejanos en el espacio, pero próximos en el tiempo; lejanos en espacio tiempo) bajo la hipótesis nula, para posteriormente compararlo con el X observado con el fin de establecer la significación del estadístico. También se puede evaluar esta significación comparando los valores observados de X con aquellos generados bajo la hipótesis nula mediante simulaciones de Monte Carlo.

Mardones y colaboradores (Mardones et al., 2013) emplearon esta prueba para determinar el patrón espacio-temporal de la propagación del virus de la anemia infecciosa del salmón en piscifactorías, considerando un límite temporal para definir casos relacionados en el tiempo de 31 días en base al período de incubación de la enfermedad en condiciones experimentales, y un límite espacial de 43 metros en base a la distancia máxima entre jaulas adyacentes. A partir de los resultados obtenidos ($p= 0,38$) concluyeron que la transmisión dentro de una misma piscifactoría era independiente de la situación espacial de las jaulas.

El método de Mantel (Mantel, 1967) cuantifica las interacciones espaciotemporales de casos de manera similar al método de Knox, pero, a diferencia del anterior, no requiere de distancias umbrales que determinen la asociación espacio-tiempo. En este caso, el estadístico T_M mide la correlación de las distancias espaciales y las distancias temporales para todos los pares de casos, como muestra la ecuación a continuación, de modo que se espera que dichas distancias sean similares en caso de existir un patrón de distribución espacio-temporal.

$$T_M = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N s_{ij} t_{ij} \quad (28)$$

Se puede aplicar una transformación (r) para reducir los efectos de distancias espaciales y temporales largas, ya que es poco probable que la correlación en enfermedades infecciosas entre las mismas sea meramente lineal:

$$r = \frac{1}{N^2 - N - 1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{(s_{ij} - \bar{s})}{s_s} \frac{(t_{ij} - \bar{t})}{s_t} \quad (29)$$

Donde \bar{s} es la media del conjunto de distancias espaciales y s_s la desviación estándar de s_{ij} , mientras que \bar{t} es la media del conjunto de distancias temporales y s_t la desviación estándar de t_{ij} , y los valores de r están limitados al intervalo $[-1,1]$.

Aunque Mantel propone una aproximación para calcular la varianza de T_M bajo la hipótesis nula de ausencia de asociación entre el espacio y el tiempo (Mantel, 1967), el método comúnmente utilizado para generar la distribución nula del estadístico es mediante simulaciones de Monte Carlo, permutando los elementos de una de las matrices de distancia y manteniendo constantes los demás; esta distribución nula se compara con los valores observados con el fin de establecer la significación del estadístico.

Chenoweth y colaboradores (Chenoweth et al., 2002) emplearon el test de Mantel para evaluar la filogeografía del pez *Urocampus carinirostris* en la costa este de Australia. Tras el análisis filogenético de las secuencias del citocromo *b* detectaron dos clados *mtDNA* monofiléticos con una importante divergencia entre sí y al analizar la distribución geográfica de los clados encontraron que ésta no era aleatoria, apuntando a que los individuos pertenecientes al clado más extendido habían experimentado durante la época del pleistoceno una gran expansión a partir de una población aislada. Rosendal y colaboradores identificaron una posible asociación entre la similitud de las secuencias genéticas del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y la proximidad espacial y temporal de los brotes causados por dichos virus en Ontario mediante la aplicación del método descrito (Rosendal et al., 2016).

El test Direccional (Jacquez, 1994; Jacquez, 1996) analiza la posible interacción espacio-temporal en datos retrospectivos y determina si la propagación observada de casos tiende a ir en una dirección concreta. El estadístico utilizado en este test es un vector (v) cuya dirección es el promedio de las direcciones de los vectores que a su vez conectan las localizaciones de casos sucesivos entre sí, y que componen la cadena de infección (Ecuación 30).

$$v = \frac{1}{m} T \otimes \begin{pmatrix} c \\ s \end{pmatrix} \quad (30)$$

Siendo c el coseno de la matriz cuyos elementos son c_{ij} ; s el seno de la matriz cuyos elementos son s_{ij} y T la matriz de conexión temporal que describe la proximidad, en el tiempo, de unos casos respecto a otros.

$$c_{ij} = \cos\Theta_{ij} = \frac{\Delta x_{ij}}{\sqrt{(\Delta x_{ij}^2 + \Delta y_{ij}^2)}}; s_{ij} = \sin\Theta_{ij} = \frac{\Delta y_{ij}}{\sqrt{(\Delta x_{ij}^2 + \Delta y_{ij}^2)}} \quad (31,32)$$

Siendo x_i e y_i las coordenadas geográficas del caso i , Δx_{ij} la distancia en el eje x entre los casos i y j [$\Delta x_{ij} = (x_i - x_j)$] y Δy_{ij} la distancia en el eje y entre los casos i y j [$\Delta y_{ij} = (y_i - y_j)$], Θ_{ij} el ángulo entre la línea horizontal y el vector que conecta las áreas i y j ; de manera que la magnitud de la dirección es inversamente proporcional a la varianza de los ángulos entre los casos conectados.

Este método de análisis se apoya en el concepto de exposición geográfica localizada, que se traduce en que los individuos cercanos a la fuente reciben dosis superiores y desarrollan sintomatología antes que aquellos más lejos de la fuente. Mediante el empleo de este test en un estudio sobre la dinámica espacial de la epidemia de diarrea porcina (PED) acontecida en una región de Japón entre diciembre de 2013 y julio de 2014 fue posible determinar que la propagación del virus se produjo en dirección noreste ($p < 0,001$), con un ángulo estimado medio de $58,8^\circ$ (Sasaki et al., 2017). Los investigadores barajaron como posible explicación del fenómeno el movimiento de personal y de camiones de transporte de alimentos y cerdos contaminados en esa dirección.

Métodos de detección de agrupamiento local:

Los métodos globales de asociación espacial asumen que el proceso espacial bajo estudio es estacionario. Como resultado, puede ignorarse la presencia de áreas de agrupamiento significativo de tipo local. Este riesgo aumenta conforme las dimensiones del área en estudio aumentan ya que los estadísticos globales resumen un número muy grande de posibles relaciones espaciales dispares (Pfeiffer, 2008). De ahí la utilidad de la aplicación de los métodos de detección de *clustering* local. Estos métodos definen las características de los *clusters* como su localización, su tamaño y la intensidad del agrupamiento, entendiendo *cluster* como un conjunto de casos de suficiente tamaño y concentración delimitado geográficamente y temporalmente, que es improbable que sea debido al azar (Knox, 1989). Revelar si estos

incidentes son consecuencia de un factor ambiental, biológico o social suele ser el objeto de estudio.

Los métodos de detección de agrupamiento local que se describen a continuación son los más ampliamente utilizados y se clasifican en función del tipo de dato (individual o agregado) para el que están diseñados.

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de datos individuales es el *spatial scan statistic* (Kulldorff and Nagarwalla, 1995), basado en la proyección gradual de ventanas circulares o cilíndricas sobre el área de estudio con el fin de identificar *clusters* espaciales o espacio-temporales, respectivamente, en las que el riesgo (por ejemplo, de enfermedad) sea superior al esperado (Pfeiffer, 2008). Este método está inspirado en el método de Openshaw, *Geographical Analysis Machine* (Openshaw et al., 1987), y es a su vez una generalización del método de Turnbull, *Cluster Evaluation Permutation Procedure* (Turnbull et al., 1990). Sobre cada localización especificada el *spatial scan statistic* construye una serie de círculos de radio variable. Cada círculo incluye las localizaciones vecinas más cercanas y el radio de cada círculo puede aumentarse continuamente desde cero hasta un máximo que normalmente se fija para incluir el 50% de la población. Para cada círculo la hipótesis alternativa es que existe un riesgo elevado de enfermedad dentro del mismo en comparación con el existente fuera de él (Kulldorff, 1998). El estadístico T_{KN} se calcula de la siguiente manera (Ecuación 33):

$$T_{KN} = \sup_z \left(\frac{O(Z)}{p(Z)} \right)^{n(Z)} \left(\frac{O(Z^c)}{p(Z^c)} \right)^{n(Z^c)} I \left(\frac{O(Z)}{p(Z)} > \frac{O(Z^c)}{p(Z^c)} \right) \quad (33)$$

Donde Z_c indica todos los círculos excepto Z , $O()$ y $p()$ son el número observado de casos y el tamaño de la población en cada área, respectivamente, e $I()$ es la función. Para determinar la significación del estadístico, se compara el T_{KN} observado con la distribución de valores generados bajo la hipótesis nula mediante simulaciones de Monte Carlo (Pfeiffer, 2008).

El *spatial scan statistic* puede utilizarse a través de distintos modelos para la localización de los *clusters* en función de si éstos son espaciales o espacio-temporales y de la naturaleza del dato a analizar. Los modelos incluidos hasta la fecha el modelo de Bernoulli, el modelo de Poisson discreto, el modelo de permutación espacio-temporal, los modelos multinomial (Jung et al., 2010), ordinal (Jung et al., 2007), exponencial (Huang et al., 2007), normal (Kulldorff et al., 2009) y normal ponderado (Huang et al., 2009) y, finalmente, el modelo de Poisson continuo (Kulldorff, 1997). A continuación, se describen en detalle los métodos más comúnmente utilizados.

El modelo de Bernoulli (Kulldorff, 1997) es ideal para datos discretos de tipo caso-control y para análisis tanto puramente espaciales como espacio-temporales; este modelo compara el número observado de casos presente en todas las posibles ventanas que pueden proyectarse sobre el área de estudio con el número esperado de casos según la hipótesis nula de distribución aleatoria de los casos (Kulldorff and Nagarwalla, 1995). Por tanto, la función de verosimilitud para una ventana específica sería la siguiente (Ecuación 34):

$$\left(\frac{c}{n}\right)^c \left(\frac{n-c}{n}\right)^{n-c} \left(\frac{C-c}{N-n}\right)^{c-c} \left(\frac{(N-n)-(C-c)}{N-n}\right)^{(N-n)-(C-c)} I() \quad (34)$$

Donde C es el número total de casos, c es el número observado de casos dentro de la ventana, N es el número total de casos y controles en el conjunto de datos y n es el número total de casos y controles dentro de la ventana. Cuando se escanea el área de estudio con el objetivo de identificar *clusters* de alto riesgo, $I()$ es igual a 1 cuando la ventana tiene más casos de los esperados bajo la hipótesis nula, e igual a 0 cuando es al contrario. También puede escanearse para la identificación de *clusters* de bajo riesgo y la interpretación sería inversa a la anterior.

La ventana con la máxima verosimilitud para una localización y tamaño concretos constituye el *cluster* más probable, es decir, el *cluster* que con menor probabilidad ha ocurrido por azar. La razón de verosimilitud de esta

ventana constituye el estadístico, que se compara con la distribución de valores generados bajo la hipótesis nula mediante simulaciones Monte Carlo.

Como ejemplo de su aplicación encontramos el trabajo de Doherr y colaboradores (Doherr et al., 2002), donde analizó la posible agrupación espacial de los casos de encefalopatía espongiforme bovina (BSE) nacidos en Suiza tras la prohibición de la alimentación del ganado con proteínas derivadas de rumiantes. Para ello se comparó la distribución de las granjas de origen de los casos nacidos tras el año 1990 con las granjas control y aquellas con casos nacidos anteriormente. Se identificaron cuatro *clusters* estadísticamente significativos en la región noroeste del país y los investigadores barajaron la existencia de factores regionales que condicionasen el control de BSE como posible explicación de esta distribución espacial heterogénea de la enfermedad.

El modelo de Poisson discreto (Kulldorff, 1997) está adaptado a datos de tipo incidencia o prevalencia (número de casos y número de personas en riesgo); la hipótesis nula sostiene que el número esperado de casos es proporcional al tamaño de la población según una distribución de Poisson. La función de verosimilitud para una ventana específica sería la siguiente (Ecuación 35):

$$\left(\frac{c}{E[c]}\right)^c \left(\frac{C-c}{C-E[c]}\right)^{C-c} I() \quad (35)$$

Donde $E[c]$ es el número esperado de casos dentro de la ventana bajo la hipótesis nula, C y c se definieron arriba y, por tanto, $C-E[c]$ es el número esperado de casos fuera de la ventana. La interpretación de $I()$ es similar a la descrita anteriormente.

Ward y Carpenter (Ward and Carpenter, 2000b) emplearon el modelo de Poisson con el fin de identificar el patrón espacial de la infestación por mosca azul en rebaños ovinos comerciales de Australia entre agosto de 1998 y mayo de 1999. La información de los casos consistía en el número de casos de infestación observados dentro de cada rebaño durante el período de monitorización. Los investigadores identificaron dos *clusters* de alto riesgo;

éstos presentaban un riesgo de infestación 2,7 y 2,8 veces superior a lo esperado, respectivamente.

El método de Permutación espacio-temporal (Kulldorff et al., 2005) requiere únicamente de los datos de ocurrencia en el espacio y en el tiempo de los casos, sin necesidad de información sobre los controles o la población en riesgo del entorno. El número de casos observados en una ventana (cilíndrica) en el espacio-tiempo se compara con lo esperado bajo el supuesto de que las localizaciones espacio-temporales de los casos son independientes entre sí. Por lo tanto, existiría un *cluster* significativo en un espacio geográfico y temporal si dicho espacio presenta una proporción de casos superior con respecto al resto de áreas y periodos de tiempo en estudio. Sindato y colaboradores evaluaron el patrón espacio-temporal de los brotes reportados de fiebre del Valle del Rift en rumiantes domésticos desde 1930 a 2007 en Tanzania (Sindato et al., 2014); al contar únicamente con encuestas sobre la presencia de la enfermedad en los diferentes distritos y municipios y no sobre posibles controles o sobre la población de su entorno, emplearon el método de permutación. Los investigadores determinaron la existencia de *clustering* persistente en el ecosistema este del Valle del Rift, posiblemente relacionado con el patrón bimodal de precipitaciones que experimenta esta área y las características de su tierra.

El estadístico Getis-Ord G^* (Ord and Getis, 1995) se aplica exclusivamente sobre datos agregados y es un indicador de agrupamiento local que mide la concentración de los valores de un determinado atributo distribuido espacialmente; es decir, compara los valores (por ejemplo, una incidencia) de una localización geográfica y sus vecinas dentro de diferentes bandas de distancia con los valores globales de dichas tasas. De esta manera, es capaz de identificar áreas donde los valores de varias localizaciones vecinas son superiores (puntos calientes) o inferiores (puntos fríos) respecto a lo esperado (media de la incidencia global en el área en estudio, en este caso), como refleja la figura a continuación:

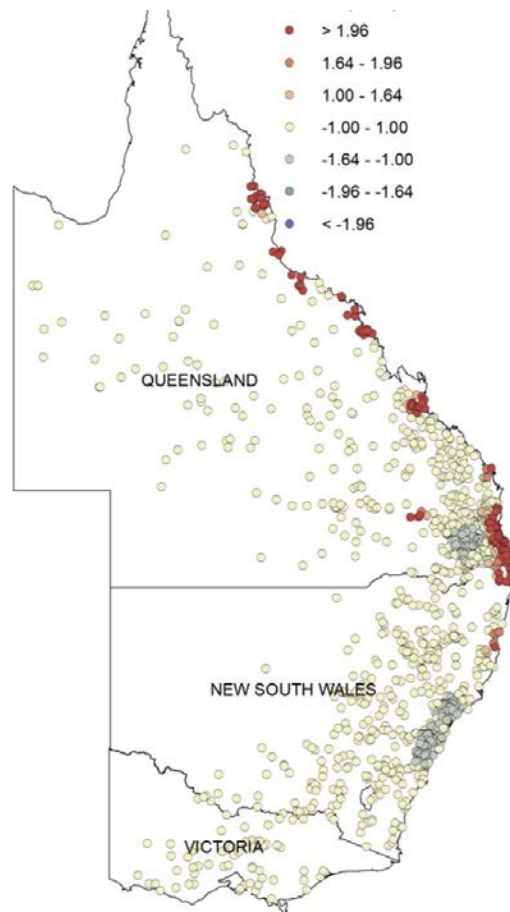


Figura 15. Representación de las localizaciones donde se reportó la presencia de especies potencialmente excretoras del virus Hendra; los círculos rojos (puntos calientes) corresponden a localizaciones con una densidad de estas especies significativamente superior (extraído de Smith et al., 2014).

Un ejemplo de su aplicación y utilidad puede encontrarse en el trabajo de Smith y colaboradores sobre la epidemiología del virus Hendra en caballos de Australia. Los investigadores señalaron las especies de murciélagos *P. alecto* y *P. conspicillatus* como principales fuentes de infección para los caballos ya que, tras el análisis espacial, observaron múltiples puntos calientes de densidad de estas especies potencialmente excretoras del virus a lo largo de

la costa este que coincidían con puntos calientes de concentración de casos en caballos (Smith et al., 2014a).

Modelos para la explicación o predicción de patrones:

Las aproximaciones que emplean modelos para la explicación o predicción de los patrones espaciales de, por ejemplo, una enfermedad, se dividen en dos grandes bloques: los métodos determinados por el dato existente y los métodos determinados por el conocimiento (Pfeiffer, 2008; Stevens and Pfeiffer, 2011). Los primeros métodos emplean conjuntos de datos que contienen información sobre diversos factores de riesgo, así como de la variable de interés, y los efectos de dichos factores de riesgo se estiman mediante métodos de regresión. Los métodos determinados por el dato pueden a su vez subdividirse dependiendo de si requieren información sobre localizaciones con presencia y ausencia de enfermedad para calibrar el modelo o si, por lo contrario, únicamente necesitan información sobre localizaciones donde se han registrado casos (y por tanto no requieren una población control). Alternativamente, la estimación de riesgos con métodos determinados por el conocimiento se basa en el entendimiento existente o especulado de las relaciones casuales que determinan la ocurrencia de enfermedad (Stevens and Pfeiffer, 2011; Stevens et al., 2013; Pfeiffer and Stevens, 2015).

Entre los métodos determinados por el dato se encuentran las aproximaciones bayesianas y también los árboles de clasificación (Breiman, 1984), los *random forests* y los árboles de regresión (*boosted regression trees*), que son capaces de trabajar con los grandes conjuntos de datos propios de la era del *Big Data* (Vatsavai, 2012; Ziegler and König Inke, 2013; Lawson, 2014; Peters Debra et al., 2014; van Zyl, 2014), además de ser menos sensibles a la autocorrelación y al incumplimiento de los supuestos de distribución normalmente asumidos en los métodos paramétricos (Pfeiffer and Stevens, 2015). Los *boosted regression trees* se aplican cada vez con mayor frecuencia para la predicción de la distribución de especies y del riesgo de enfermedad (Martin et al., 2011; Hay et al., 2013; Gilbert et al., 2014; Pigott et al., 2014), mientras que los *random*

forests se han aplicado, entre otros ejemplos, para la generación de mapas de riesgo de ocurrencia de malaria y de flujo de movimientos de personas basados en el registro de la localización de llamadas de teléfonos móviles con el fin de describir la variación espacial en la exportación/importación potencial de malaria en Namibia (Tatem et al., 2014).

Mientras que los métodos determinados por el dato aún dominan los modelos espaciales, el uso de métodos basados en el conocimiento ha aumentado durante los últimos 15 años (Pfeiffer and Stevens, 2015). Éste es el caso de los modelos dinámicos como el análisis de decisión basado en criterios múltiples (*multi-criteria decision analysis*, MCDA), cuya clave es la integración del conocimiento generado en diferentes disciplinas. Aunque estos métodos y la interpretación de sus resultados presentan un sesgo potencial y una subestimación de la variabilidad como consecuencia de que la estructura de los modelos esté basada en la opinión de expertos al igual que, en muchos casos, los parámetros (Malczewski, 2006), el uso continuado de MCDA ha resultado también en el desarrollo de metodologías que reducen la influencia de la subjetividad de criterios individuales sobre la estimación de riesgo (Yemshanov et al., 2013; Feizizadeh et al., 2014; Jankowski et al., 2014; Ligmann-Zielinska, 2014). Entre los ejemplos de su aplicación en sanidad animal encontramos el trabajo de Clements y colaboradores y el de Stevens y colaboradores en la generación de mapas de predicción de la fiebre del Valle del Rift en Africa (Clements et al., 2006) y de la influenza aviar H5N1 en Asia (Stevens et al., 2013), respectivamente.

Software:

Entre los programas informáticos GIS destacables se encuentra ArcGIS (ESRI, CA, USA) (www.esri.com), que es seguramente el paquete comercial más utilizado, la aplicación de dominio público QGIS (QGIS Development Team, 2009), el programa IDRISI de Clark Labs (www.clarklabs.com), la aplicación de libre acceso GRASS GIS (es.wikipedia.org/wiki/GRASS_GIS), los programas ERDAS Imagine y ER Mapper de Leica Geosystems (leica-geosystems.com/es-es), además de muchos otros (Steiniger, 2009).

Los programas especializados en análisis espacial incluyen el producto comercial ClusterSeer (www.terraser.com) y los programas de dominio público SaTScan (Kulldorff, 2009) y FlexScan (Tango and Takahashi, 2005; Tango, 2008; Tango and Takahashi, 2012), que permiten el análisis espacial (y espacio-temporal) de *clusters*; GeoDa (<https://geodacenter.github.io/index.html>), también de acceso libre; una variedad de paquetes implementados en R (RCoreTeam, 2017) como *cluster* (Maechler, 2017), *spatstat* (Baddeley, 2018), *spatial* (Venables, 2002), *splancs* (Rowlingson and Diggle, 1993) o *spatialkernel* (cran.r-project.org/web/packages/spatialkernel/index.html); el módulo S+SpatialStats del programa comercial S-Plus (Harrell, 2001) y el programa OpenBUGS (Lunn et al., 2009) que proporciona herramientas especializadas en el análisis Bayesiano de información espacial.

3.1.2.3. Monitorización de estrategias de vigilancia y control

En los casos de enfermedades de relevancia en sanidad animal frente a las que se implementan medidas de prevención, control o erradicación es fundamental conocer la efectividad esperada de dichas estrategias ya que normalmente suponen una importante inversión tanto para el ganadero como para la administración. Sin embargo, no siempre es fácil determinar cuál es su potencial efecto debido a la heterogeneidad de la información disponible y a la diversidad de las metodologías empleadas en su evaluación, que dan lugar a una gran variedad de resultados recogidos en la bibliografía científica. En este contexto, la revisión sistemática y el meta-análisis pueden ser herramientas de gran utilidad.

3.1.2.3.1. Revisión sistemática y meta-análisis

El objetivo principal de una revisión bibliográfica es determinar el grado de evidencia existente para evaluar una hipótesis de trabajo sobre un tema definido y, por tanto, la unidad de estudio es cada investigación realizada con anterioridad sobre el tema de interés.

Las revisiones clásicas (“narrativas”) presentan limitaciones derivadas fundamentalmente de su carácter subjetivo, ya que no se realizan siguiendo

una estrategia formal para la identificación de la bibliografía relevante y la extracción de información útil. Por este motivo estas revisiones son más susceptibles de ser afectadas por sesgos. Sin embargo, la metodología de las revisiones sistemáticas corrige estas limitaciones (Oxman et al., 1994; Delgado, 2010).

La revisión sistemática parte de una hipótesis claramente formulada y emplea métodos reproducibles y formulados de manera explícita para identificar, seleccionar y evaluar críticamente investigaciones relevantes, y para recopilar y analizar sus datos (Moher et al., 2009; Higgins, 2011). El uso de estos métodos limita la aparición de sesgos y el error aleatorio (Shamseer et al., 2015). Los métodos estadísticos (meta-análisis) pueden o no ser utilizados en una segunda fase para analizar y sintetizar los resultados de los estudios incluidos. Por tanto, el meta-análisis se refiere al empleo de técnicas estadísticas en una revisión sistemática, con el fin de integrar los resultados analíticos de los estudios incluidos en la misma (DerSimonian and Laird, 1986).

Los objetivos concretos de la combinación de la revisión sistemática y el meta-análisis son la valoración de la consistencia entre los resultados obtenidos en diferentes estudios realizados con un mismo objetivo, la obtención de un mejor estimador global de dichos resultados, y la valoración de la calidad de la metodología empleada en cada una de las investigaciones individuales (Delgado, 2010), así como la identificación de patrones de publicación que podrían revelar la presencia de sesgos.

La evaluación crítica y la síntesis sistemática de hallazgos de la investigación emergieron en 1975 bajo el término "meta-análisis" (Glass, 1977). El término fue acuñado por el investigador y estadístico Gene V. Glass, quién empleó esta metodología en diversas áreas de la psicoterapia (Smith and Glass, 1977). Así, en un inicio, este tipo de síntesis fue empleada en políticas públicas e intervenciones sociales, pero no tardó en aplicarse a la investigación en ciencias de la salud.

De manera paralela, se publicaba el texto "Efectividad y eficiencia" de Archie Cochrane (Cochrane, 1972), el cual instaba a los profesionales de la salud a

la práctica de la medicina basada en la evidencia; ésta fue definida más tarde como “el uso consciente, explícito y juicioso de la mejor evidencia disponible para tomar decisiones sobre el cuidado de pacientes individuales” (Sackett et al., 1996).

Así, a finales de la década de 1970 y principios de los 80, un grupo de investigadores de los servicios de salud en Oxford preparó el terreno para la medicina basada en la evidencia al iniciar un programa de revisiones sistemáticas sobre la eficacia de las intervenciones en atención a la salud (Clarke and Langhorne, 2001). La Colaboración Cochrane abrió su centro en Oxford en 1992 (Chalmers et al., 1992) y actualmente es una red internacional de investigadores, académicos, profesionales y usuarios comprometidos con los principios de la gestión de los conocimientos de salud, de manera que éstos sean accesibles y de una calidad asegurada.

No tardó en reconocerse la necesidad de revisiones sistemáticas más allá del campo de la salud. Fue así como surgió la Colaboración Campbell, que adaptó la metodología Cochrane para aplicarla en otras áreas de la política pública (Gill et al., 2014; Telep et al., 2014).

A día de hoy, puede observarse como esta metodología está también presente en la investigación en el terreno de la sanidad animal, donde ha sido aplicada para el análisis de estudios con objetivos muy dispares entre sí, desde la descripción de un determinado fenómeno como la incidencia de una enfermedad o la ecología de un hospedador (Eble et al., 2008; Whittington and Windsor, 2009; Mardones et al., 2010; Byrne et al., 2014; Socias et al., 2014; Belo et al., 2015; Jackson, 2015; Asmare et al., 2016; Martinez-Gutierrez and Ruiz-Saenz, 2016; Quesada et al., 2016; Tadesse, 2016; Verschave et al., 2016; Compton et al., 2017; Haghi et al., 2017; Shokri et al., 2017; Foley et al., 2018; Legatti et al., 2018), el análisis de presuntos factores de riesgo (Otero-Abad and Torgerson, 2013; Agunos et al., 2014; Denagamage et al., 2015; Laranjo-Gonzalez et al., 2016; Njeru et al., 2016; Farquharson et al., 2018; Sharifi et al., 2018), la valoración de pruebas diagnósticas (Stegeman et al., 2000; Leeflang et al., 2008; Bae, 2014; Leeflang, 2014), así como de tratamientos y estrategias

de vigilancia y control (Adkin et al., 2006; Aragon et al., 2007; Irwin, 2010; Romero and Boelaert, 2010; Dufour et al., 2011; da Silva et al., 2014; Sargeant et al., 2014; Ducrotoy et al., 2015; Jibat et al., 2015; Kashangura et al., 2015; Rodriguez-Prieto et al., 2015; Bouzid et al., 2016; Carvalho et al., 2016; Laranjo-Gonzalez et al., 2016; Uehlinger et al., 2016; Muir et al., 2017; Newcomer et al., 2017; Pinior et al., 2017; Villanueva-Cabezas et al., 2017; Tambella et al., 2018), entre otros.

El esquema general de una revisión sistemática sería el siguiente: el planteamiento de una hipótesis de trabajo con el fin de dar respuesta a una pregunta científica concreta, por ejemplo ¿existe asociación entre una estrategia de control específica y la disminución de la incidencia de una enfermedad?; la selección de la población en estudio, etapa en la que se seleccionan las fuentes de información (bases informatizadas o búsqueda manual) y los criterios de búsqueda a seguir en ellas de acuerdo a una serie de palabras clave, además de establecer de antemano unos criterios de inclusión/exclusión para seleccionar únicamente las investigaciones de interés en base al objetivo del estudio, el tipo de diseño, el idioma, etc.; la recogida de la información de una manera estandarizada para valorar la validez de los estudios primarios; y finalmente, si la información extraída lo permite, el meta-análisis, que deberá contemplar el uso de métodos para el control de la heterogeneidad intra y entre investigaciones, y de los posible sesgos (Moher et al., 2007; Moher et al., 2009; Shamseer et al., 2015; Page et al., 2016).

Tras el planteamiento de la pregunta, fase inicial del estudio, el siguiente paso a seguir es la búsqueda de la información, que equivaldría a la definición de la población de estudio en una investigación convencional. En una revisión sistemática, la población objetivo está compuesta por todos los estudios realizados sobre el tema de interés, hayan aparecido o no en alguna publicación. Por tanto, la estrategia de búsqueda idónea se basaría en la búsqueda de toda la información disponible, si bien con frecuencia y por motivos prácticos las revisiones se centran sólo en estudios publicados, opción susceptible al sesgo de publicación (ver más adelante). En ocasiones pueden llegar a utilizarse los datos originales generados en los estudios a combinarse,

aunque esta opción es poco utilizada por la ausencia de disponibilidad de dichos datos (Delgado, 2010).

El sesgo de publicación, que se citó en el párrafo anterior, es el sesgo derivado de la tendencia a la publicación de resultados positivos y rechazo/ocultación de los resultados negativos (o no significativos) (Dwan et al., 2008). Esto puede traducirse en un sesgo de selección en la revisión sistemática y meta-análisis cuyo universo sean solo estudios publicados y de gran relevancia, ya que, si los resultados publicados no son representativos del espectro real de resultados obtenidos, las conclusiones del mismo podrán ser erróneas (Sutton, 2005; Dickersin, 2006).

Una vez identificada la población en estudio, comienza la fase de búsqueda de los estudios relevantes, que normalmente se lleva a cabo en repertorios, la mayoría informatizados, o mediante la consulta de los libros de actas de congresos y reuniones científicas, tesis doctorales, etc. Dicha búsqueda puede completarse mediante el contacto directo con investigadores que hayan estudiado el problema y a través de la consulta de la bibliografía de cada artículo localizado. Es preferible que se consulte un mínimo de dos repertorios y que dicho proceso se realice por dos investigadores en paralelo y de manera independiente con el fin de asegurar la reproducibilidad del proceso. Los repertorios más utilizados en ciencias de la salud son: *Medline* (www.pubmed.gov), *Embase* (www.embase.com), *Scopus* (www.scopus.com), *Cochrane Library* (www.cochranelibrary.com), *CAB abstracts* (www.cabi.org), *CINAHL (Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature; www.ebscohost.com/nursing/products/cinahl-databases)*, *LILACS (Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud; <http://lilacs.bvsalud.org>)*, *PASCAL* (www.dialog.com), *OVID* (www.ovid.com) e *ISI Web of Knowledge* (apps.webofknowledge.com). Algunos de los repertorios anteriores, como *Medline*, permiten la posibilidad de búsqueda por palabras clave (*MeSH, Medical Subject Headings*) que corresponden a términos que figuran en los apartados de título, resumen o palabras clave de artículos indexados; es una manera de refinar la búsqueda, aunque ésta no debería fundamentarse sólo en las palabras clave sino también incluir

sinónimos a través de la opción de búsqueda libre. El principal inconveniente del uso de estos repertorios es que no son exhaustivos de todas las revistas que existen o, simplemente, muchos solo incluyen revistas y no libros u otros.

Una vez seleccionados los repertorios a consultar ha de redactarse la cadena de búsqueda, es decir, el conjunto de palabras clave y sinónimos que se emplean con el fin de que el buscador identifique los estudios que interesan. Dicha cadena de búsqueda debe ser anotada cuidadosamente para permitir la repetición del proceso de búsqueda en el futuro por el mismo u otros grupos investigadores. En su elaboración deben ponderarse los criterios de sensibilidad (incluir todos aquellos estudios relacionados con el objeto de la revisión) y especificidad (no incluir estudios con otros objetivos no relacionados que no aporten información a la revisión), un aspecto complejo y que normalmente conduce a la construcción de varias cadenas de búsqueda, cuya eficacia puede valorarse en un pequeño número de artículos. Una vez formulada la cadena óptima se realizará la búsqueda, anotándose la fecha en la que se haga.

Las referencias de los estudios identificados a través de la búsqueda son entonces importadas a un gestor bibliográfico para facilitar su manejo y clasificación, además de la identificación de los duplicados para su eliminación. Entre los gestores más comúnmente utilizados se encuentran: Refworks (www.refworks.com), EndNote (www.endnote.com), Zotero (www.zotero.org) y Reference Manager (www.refman.com).

Los estudios reunidos a través de la búsqueda constituyen la serie inicial de investigaciones participantes, pero no todos ellos serán incluidos en el análisis. A continuación, viene la fase de aplicación de los criterios de inclusión de los estudios que formarán parte de la revisión sistemática y el posible meta-análisis. Estos criterios deben establecerse de antemano, sin tener en cuenta los resultados de los estudios pre-seleccionados, para así minimizar el sesgo de selección. Uno de los criterios de restricción que más frecuentemente se aplica es el idioma, ya que normalmente los grupos de investigación dominan un número limitado de idiomas. Muchos estudios se centran sólo en estudios

publicados en inglés, aunque esto pueda dar lugar a la obtención de una muestra sesgada. Sin embargo, la elección del idioma puede estar sujeta también a los objetivos de la revisión, como podría ser investigaciones en un determinado ámbito (por ejemplo, revistas científicas latinoamericanas) o localización geográfica. Otros criterios de inclusión son el tipo de diseño (por ejemplo, que contemplen la aleatorización en los ensayos clínicos), el tipo de publicación (normalmente centrada en estudios primarios en detrimento de revisiones, cartas, etc.) o, de forma más específica, las características de la exposición y del efecto según los objetivos de la investigación. También pueden considerarse criterios restrictivos en lo que a la calidad metodológica de las investigaciones respecta.

Una vez establecidos los criterios de inclusión se lleva a cabo la primera revisión que normalmente se circunscribe al título y resumen de todos los estudios identificados para verificar que cumplen dichos criterios. Con el fin de incrementar la objetividad del proceso este paso suele ser realizado por dos o más investigadores, de forma que los estudios solo queden incluidos/excluidos (en función de si se quiere potenciar la especificidad o la sensibilidad de la búsqueda, respectivamente) en caso de unanimidad. Tras este primer cribado, el manuscrito completo de los estudios que se conserven deberá ser obtenido y revisado con el fin de confirmar que cumple los criterios de inclusión y extraer la información de interés. La bibliografía de estos artículos es normalmente también revisada con el fin de identificar otros estudios relevantes, los cuales son sometidos al mismo proceso de selección descrito. El flujo de información durante el proceso de revisión sistemática aparece representado en la Figura 16.

Diagrama de flujo PRISMA

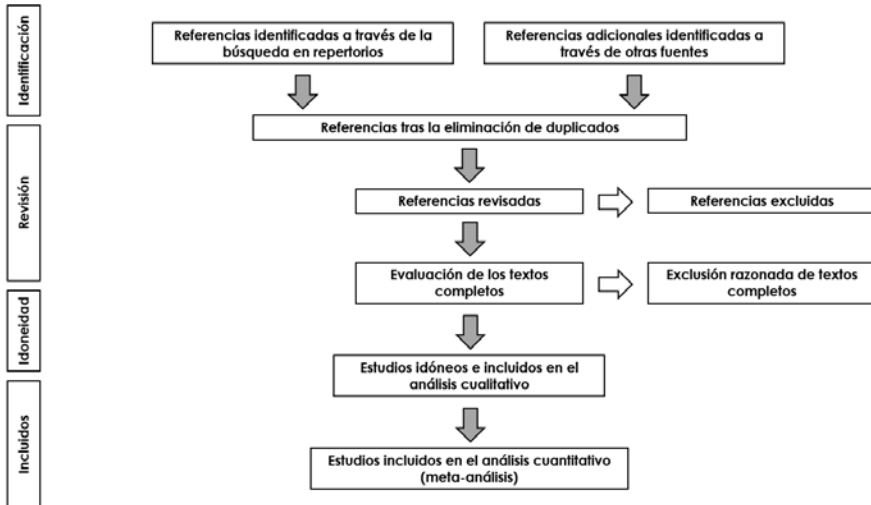


Figura 16. Diagrama de flujo de una revisión sistemática y meta-análisis (adaptado de Moher et al., 2009).

La extracción de la información debe llevarse a cabo de una manera estandarizada, normalmente utilizando una base de datos preparada a tal efecto y con las características de interés especificadas de antemano. Dependiendo del tipo de estudio la información de interés variará, pero generalmente el año de publicación, los autores y el país donde se desarrolló el estudio son datos imprescindibles.

La valoración de la calidad de las investigaciones incluidas en la revisión sistemática es un aspecto central de ésta (Mulrow, 1987; Sacks et al., 1987; Sacks et al., 1996). A raíz de esta valoración se pueden llevar a cabo una serie de recomendaciones metodológicas que pueden ser útiles para futuros estudios sobre el tema. La calidad de un estudio afecta de manera obvia a la probabilidad de la existencia de sesgos en el mismo, y a la fiabilidad de los datos extraídos del mismo, lo que puede a su vez conducir a sesgos en el estimador conjunto obtenido en un meta-análisis. Las revisiones sistemáticas que combinan estudios de calidad variable (más frecuentes en epidemiología observacional) pueden verse afectadas por errores sistemáticos, lo que puede

traducirse en errores de tipo I (el rechazo de una hipótesis nula verdadera) o tipo II (la aceptación de una hipótesis nula falsa) (Delgado, 2010), además de por una mayor heterogeneidad del efecto.

Para llevar a cabo esta valoración, es necesario disponer de un cuestionario de evaluación de la investigación, y que este proceso se lleve a cabo de la manera más cuidadosa posible para evitar el sesgo de observador. Para ello la información relativa a la institución ejecutora de cada estudio, el nombre de sus autores, y la magnitud, sentido y significación estadística del efecto detectado debería enmascarse a los evaluadores. Por tanto, estos evaluadores no formarán parte del proceso de recogida de información descrito anteriormente. Al igual que en tareas anteriores la valoración debería llevarse a cabo por dos evaluadores en paralelo y de manera independiente. Los cuestionarios de evaluación tienen el inconveniente de su validación, dado que no existen cuestionarios ideales para ser aplicados en toda situación. En la literatura científica se han publicado muchos cuestionarios para la evaluación de ensayos clínicos controlados (Chalmers et al., 1981; Detsky et al., 1992; Jadad et al., 1996; Verhagen et al., 1998; Moher et al., 2001; Higgins, 2011); sin embargo, en lo que a estudios observacionales se refiere, no existe ningún cuestionario maestro, aunque la declaración STROBE (*STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology*) puede servir de guía (Elm et al., 2007; Gallo et al., 2012; Vandembroucke et al., 2014). Los items de estos cuestionarios pueden servir de orientación a la hora de confeccionar uno que se adapte a la hipótesis sobre la que se trabaja. En concreto, para la valoración de estudios que evalúan estrategias de control se encuentra el cuestionario desarrollado por van Tulder y colaboradores (van Tulder et al., 2003) y que ha sido frecuentemente empleado en este tipo de estudios.

El siguiente paso corresponde a la estimación cuantitativa de la relación entre las variables contempladas en los estudios revisados (por ejemplo, una estrategia de control y la reducción de la incidencia de una enfermedad) y su magnitud, es decir, la fase de meta-análisis. En el meta-análisis se combinan los resultados publicados o se combinan las bases de datos originales,

aumentando así la precisión de las estimaciones del efecto que se estudia (Delgado, 2010).

Para llevar a cabo el meta-análisis han de extraerse los datos numéricos correspondientes al efecto investigado en cada uno de los estudios seleccionados. Al igual que durante la extracción del resto de información, este proceso debería estar estandarizado para asegurar que cada uno de los estudios es tratado de igual manera. El escenario ideal es aquel en el que se pueden extraer los datos crudos que permitan la estimación de las medidas de asociación aplicando las fórmulas habituales, por ejemplo, la extracción de las frecuencias de las tablas de contingencia para el cálculo de la razón de odds, respetando una posible estratificación de los resultados (medidas ajustadas por una o más variables). No obstante, sería suficiente con el valor de la medida de asociación objetivo (Razón de Odds, Riesgo Relativo, Diferencia de Riesgo, Diferencia media, Diferencia media estandarizada, etc.) de cada estudio y una medida del error asociado al mismo. Para fenómenos binarios, las principales medidas de asociación empleadas en el contexto del meta-análisis son el Razón de Odds (*Odds Ratio*, OR), el Riesgo Relativo (RR) y la Diferencia de Riesgo (*Risk Difference*, RD) (Deeks, 2002; Deeks and Altman, 2008), especialmente las dos primeras ya que son medidas más estables que la RD, especialmente si los estudios incluyen pacientes con diferentes periodos de seguimiento (Engels et al., 2000; Deeks, 2002). Para fenómenos continuos, las medidas de efecto normalmente estudiadas son la Diferencia media (MD) y la Diferencia media estandarizada (Schwarzer et al., 2015); la MD se emplea cuando todos los estudios miden el efecto con la misma escala, mientras que la segunda se emplea en el caso de diferentes escalas (Schwarzer et al., 2015). Puede consultarse el procedimiento específico para el cálculo de cada una de las medidas citadas en (Schwarzer et al., 2015).

El método de ponderación de estudios y combinación de sus resultados más utilizado es el método del inverso de la variancia (L Fleiss, 1993; Delgado, 2010). Este método es válido tanto para variables dicotómicas (presencia o ausencia de un efecto) como para fenómenos continuos (por ejemplo: grado de severidad de una enfermedad) y requiere de la variancia (o del error

estándar) de la medida de asociación de cada estudio. El principio del método del inverso de la variancia consiste en la definición de una medida de asociación θ_i entre la exposición y el efecto en cada estudio "i" a combinar. En el caso de un fenómeno binario, si no hay asociación θ_i será igual a 0 (si la medida es una diferencia) o a 1 (si es una razón). En el meta-análisis se combinan las estimaciones del parámetro θ de cada estudio mediante el concepto de media ponderada:

$$\theta_p = \frac{\sum w_i \theta_i}{\sum w_i} \quad (36)$$

En la que θ_p es el parámetro ponderado, θ_i y w_i son respectivamente el parámetro y el peso asignado al estudio "i". Bajo la hipótesis nula se asume que θ_p sigue una ley Normal. Si la medida que se elige es una diferencia de riesgos o de tasas, no es necesaria ninguna transformación para que se cumpla el supuesto de normalidad; sin embargo, otras medidas necesitan una transformación para que se cumpla este supuesto, como es la transformación logarítmica en el caso del riesgo relativo (RR).

El método del inverso de la variancia que, como se mencionó anteriormente, es aquel que puede aplicarse cuando se tiene información sobre la medida de asociación de cada estudio y su correspondiente error estándar (o su variancia), es el único que permite combinar los estudios con un modelo de efectos fijos y uno de efectos aleatorios (L Fleiss, 1993; Thompson, 1993; Pocock, 2007; Delgado, 2010). La principal diferencia entre ambos es la manera de considerar el nivel de heterogeneidad observado dentro y entre los estudios. El grado de heterogeneidad entre estudios puede evaluarse mediante la prueba Q de homogeneidad, que se basa en la suma ponderada (empleando los pesos anteriores, w_i) del cuadrado de las diferencias entre los efectos de los estudios individuales (θ_i) y el efecto global (θ_p) (Gavaghan et al., 2000); para la interpretación del estadístico Q se emplea la ley de Chi-cuadrado (con grados de libertad igual al número de estudios menos 1). Debido a que la fiabilidad de esta prueba es muy dependiente del número de estudios que se combinan, este análisis puede complementarse mediante otros dos estadísticos adicionales, el estadístico de Higgins (I^2) y el estadístico

tau (τ^2). I^2 indica la proporción de variabilidad en las estimaciones del efecto que se debe a la heterogeneidad entre los estudios (Higgins and Thompson, 2002), de modo que según una escala utilizada en la literatura un I^2 entre 0 y 40% indica una heterogeneidad leve, de 30 a 60% moderada, de 50 a 90% sustancial y de 75 a 100% considerable (Deeks, 2008). Por otro lado, τ^2 indica la variabilidad existente entre estudios y cuando este estadístico es negativo sugiere que dicha variabilidad es inexistente (DerSimonian and Laird, 1986; Delgado, 2010). El uso de estos estadísticos permite determinar el grado de heterogeneidad entre los resultados procedentes de distintos estudios y así valorar la idoneidad de utilizar un modelo de efectos fijos (en caso de que ésta sea despreciable o leve) o aleatorios (cuando dichos niveles son considerables, de modo que se considere en el análisis).

El fundamento del procedimiento con un modelo de efectos fijos coincide con el de un análisis estratificado para la estimación del riesgo relativo (RR) y derivados (razón de odds y de tasas) pero, en el caso del meta-análisis, los estratos equivalen a los estudios individuales incluidos en el análisis. Este modelo asume que los efectos estimados de los estudios incluidos en el análisis provienen de una población homogénea (Schwarzer et al., 2015). El peso de cada estudio individual en un modelo de efectos fijos está definido por el inverso de la variancia de su parámetro (por ejemplo, RR de enfermedad para una población expuesta), es decir, por el inverso de la variabilidad intra-estudio, tal y como se refleja en las ecuaciones a continuación:

$$w_i = \frac{1}{\text{Var}(\theta_i)}; SE(\theta_p) = \sqrt{1/\sum w_i} \quad (37,38)$$

Cuando se aplica un modelo de efectos fijos y la variable en estudio es binaria los efectos pueden combinarse, además de con el método del inverso de la variancia, con el método de Mantel-Haenszel o con el método de Peto. Estos métodos son más apropiados para situaciones donde el tamaño muestral dentro de cada estudio es limitado o cuando la probabilidad de un determinado evento está muy próxima a 0 (0%) o a 1 (100%) (Breslow, 1981; Greenland and Robins, 1985), es decir, cuando en una tabla de 2x2 existe una frecuencia muy baja en alguna de las casillas.

El método de Mantel-Haenszel puede usarse para combinar los resultados de estudios que recojan medidas de asociación en forma de OR, RR y tasa de incidencia (*Incidence Rate*, IR) (Mantel and Haenszel, 1959; Greenland and Robins, 1985; Engels et al., 2000); en las siguientes ecuaciones se refleja el procedimiento de combinación de las medidas individuales:

$$\theta_{MH} = \frac{\sum w_i \theta_i}{\sum w_i}; \text{ siendo } \theta_i = OR_i \text{ o } RR_i \text{ o } IR_i \quad (39)$$

$$w_i \text{ para } OR_i = \frac{b_i c_i}{n_i}; w_i \text{ para } RR_i = \frac{(a_i + b_i) c_i}{n_i} \quad (40, 41)$$

siendo a_i el número de individuos expuestos con resultado positivo en la variable resultado (por ejemplo, presencia de enfermedad), b_i el número de expuestos con resultado negativo en la variable respuesta, c_i y d_i el número de individuos no expuestos con resultados positivos y negativos en la variable respuesta respectivamente, y n_i la suma de los cuatro anteriores.

El método de Peto es una variante del método del inverso de la variancia y es exclusivo para la combinación de OR (Yusuf et al., 1985; Bradburn et al., 2007). El procedimiento de combinación de las OR individuales sería el siguiente:

$$\theta_{Peto} = \exp\left(\frac{\sum w_i \log \theta_i}{\sum w_i}\right); \text{ siendo } \theta_i = OR_i; w_i = \frac{1}{Var(\log \theta_i)} \quad (42, 43)$$

En un modelo de efectos aleatorios, donde no se asume que los resultados de todos los estudios proceden de una misma población, ponderando según el método del inverso de la variancia, el peso de cada estudio individual es la suma de los inversos de la variabilidad intra-estudio y de la variabilidad entre estudios (τ^2), tal y como se refleja en las ecuaciones a continuación:

$$w_i^* = \frac{1}{Var(\theta_i) + \tau^2}; SE(\theta_p) = \sqrt{1/\sum w_i^*} \quad (44, 45)$$

Esta variabilidad entre estudios puede deberse a diferencias en los protocolos empleados en las investigaciones, periodos de seguimiento, selección de los pacientes, etc., y es por tanto esperable en la mayor parte de los casos, por lo que con frecuencia debe ser tenido en cuenta (Delgado, 2010).

Como puede observarse en las ecuaciones anteriores, a menor peso [sea éste w_i (modelo de efectos fijos) o w_i^* (modelo de efectos aleatorios)] mayor error estándar del parámetro ponderado y por tanto mayor IC 95%.

Finalmente, y con el fin de valorar y reportar la magnitud del estimador ponderado de la asociación entre la exposición y el efecto estudiados, es preferible el uso de los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) del estimador en lugar del valor p , ya que existe una tendencia a encontrar resultados estadísticamente significativos conforme el número de estudios a combinar aumenta (posible error de tipo I), aunque en la mayoría de los meta-análisis se comunican ambos valores.

Existen diferentes gráficos para la representación de las estimaciones del efecto (Anzures-Cabrera and Higgins, 2010). Los gráficos de intervalo, donde se representa la magnitud del efecto junto con su IC 95%, ayudan a visualizar las medidas individuales que se están combinando en el meta-análisis. Estos gráficos se obtienen situando los diferentes estudios en el eje de ordenadas, y representando el IC 95% del efecto estimado en cada estudio en el eje de abscisas, además de añadir en el límite inferior la estimación ponderada del conjunto de estudios obtenida en el meta-análisis con su IC 95% (Figura 17):

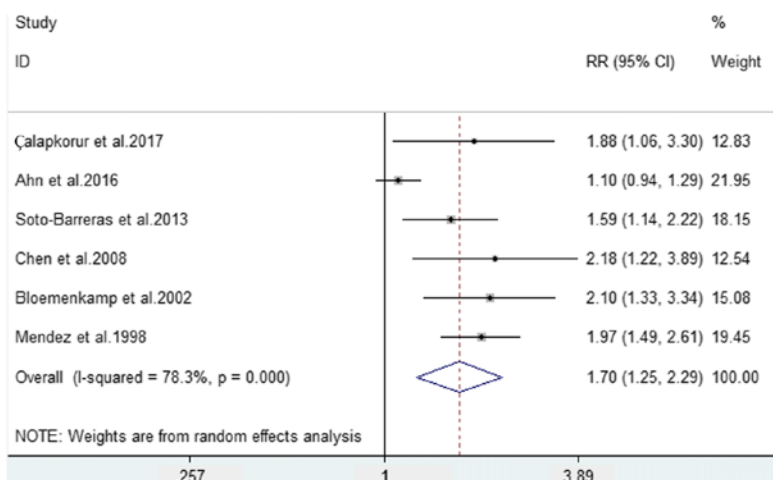


Figura 17. Gráfico de intervalo representando el RR de enfermedad arterial periférica en pacientes con/sin periodontitis (extraído de Yang et al., 2018).

El diagrama de bosque (*forest plot*) guarda cierta similitud con el anterior pero los estudios se presentan en orden ascendente de error estándar para situar en la parte inferior del gráfico los estudios con una mayor precisión (y así conformar la forma de un árbol) (Delgado, 2010). La magnitud del efecto se representa mediante un cuadrado o un círculo cuya área es proporcional al peso de cada estudio, y la estimación ponderada del conjunto de estudios se representa con un rombo o una elipse de anchura igual a la amplitud del IC 95% de la estimación ponderada obtenida en el meta-análisis (Figura 18).

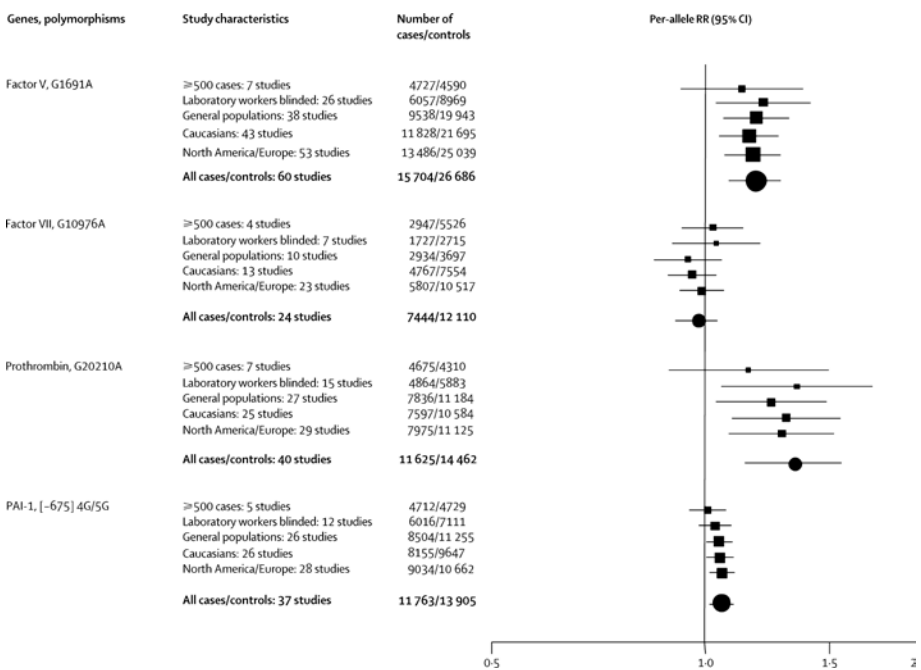


Figura 18. Forest plots representando el efecto de determinados polimorfismos de genes hemostáticos sobre el riesgo de enfermedad coronaria (extraído de Ye et al., 2006).

Si estos gráficos representan efectos estimados con RR o OR, Galbraith propone dibujarlos con el eje de abscisas en escala logarítmica para que el límite superior e inferior de los IC sean simétricos alrededor de la estimación puntual del parámetro (Galbraith, 1988).

La última fase del meta-análisis debe ser la evaluación de la existencia de sesgo de publicación entre los estudios incluidos en el meta-análisis, hecho

que puede amenazar seriamente la fiabilidad de la estimación ponderada. La mayoría de los procedimientos para detectar este sesgo asumen que los estudios pequeños (con pocos sujetos) se publican más según la magnitud y significación de los resultados que se encuentren (mayor probabilidad de publicación si el efecto detectado es de mayor magnitud y significativo) (Delgado, 2010). La lógica de la prueba de significación implica que un estudio con un tamaño de muestra pequeño sólo resultará en una OR o RR estadísticamente significativa si estos parámetros tienen valores más alejados de la unidad de lo que sería necesario si el tamaño de muestra fuera mayor. Con el fin de valorar este sesgo, Vandembroucke propone una aproximación basada en los gráficos de embudo (*funnel plots*), en los que la magnitud del efecto (RR en escala logarítmica u otro) de cada estudio se enfrenta al valor de su error estándar (Vandembroucke, 1988) o a su tamaño muestral. La existencia de una figura simétrica alrededor del eje que se traza a la altura del valor del parámetro ponderado (Figura 19) señala la ausencia de este error. Este gráfico puede denominarse también gráfico de árbol de navidad (*Christmas tree*) cuando el eje de ordenadas corresponde al error estándar o al tamaño de muestra y el de abscisas a la magnitud del efecto.

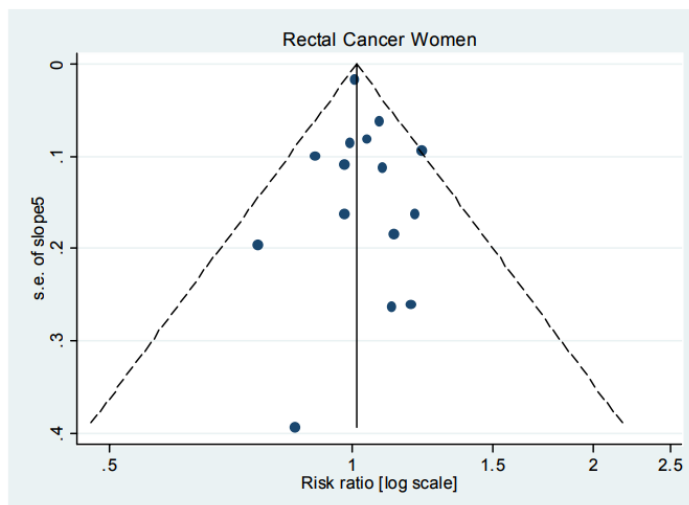


Figura 19. Funnel plot (o Christmas tree) del meta-análisis de la asociación entre el índice de masa corporal y la incidencia de cáncer (extraído de Renehan et al., 2008).

Además de la aproximación gráfica, el sesgo de publicación puede evaluarse más formalmente mediante la prueba estadística de Macaskill (Macaskill et al., 2001), basada en el ajuste de un modelo de regresión lineal entre la magnitud de los efectos y el tamaño muestral de los estudios; una pendiente cercana o igual a cero y no significativa apunta a una ausencia de sesgo de publicación en el meta-análisis.

Software:

Todos los procedimientos explicados anteriormente se pueden realizar con los siguientes softwares: la *Macro! MAR V2012.03.20*® (Domenech, 2012) de aplicación mediante el programa estadístico SPSS (IBM Inc., Chicago, IL, USA), y paquetes especializados en meta-análisis (Schwarzer et al., 2015) implementados en R (RCoreTeam, 2017), entre los que se encuentra el paquete *mada* (Doebler, 2015), *meta* (Schwarzer, 2007), *metafor* (Viechtbauer, 2010), *mvmeta* (Gasparini et al., 2012); en el caso de aplicación de modelos Bayesianos, también pueden utilizarse los programas WinBUGS (Lunn et al., 2000) y OpenBUGS (Lunn et al., 2009), como se describe en (Thomas et al., 2006).

Protocolos para ejecución de revisiones sistemáticas y meta-análisis:

La fiabilidad de las revisiones sistemáticas se basa en una adecuada planificación y se verá reflejada en la documentación de la metodología seguida en los protocolos correspondientes. Estos protocolos son importantes porque permiten a los autores planificar y anticiparse a posibles problemas, documentar su plan de trabajo para que otros investigadores puedan consultarlo, compararlo, replicarlo y juzgar su validez, y evitar decisiones arbitrarias en lo que a criterios de inclusión y extracción de la información respecta (Shamseer et al., 2015). Varias organizaciones internacionales, como la Colaboración Cochrane (*Cochrane Collaboration*), la colaboración Campbell (*Campbell Collaboration*) y la Agencia para la Investigación y su Calidad en Ciencias de la Salud (*Agency for Healthcare Research and Quality*) demandan y publican regularmente protocolos para revisiones sistemáticas. Actualmente, el protocolo más utilizado es la declaración PRISMA

(*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) (Moher et al., 2009), que es una actualización de la declaración QUOROM (*Quality of Reporting of Meta-analyses*) (Moher et al., 1999). La declaración PRISMA consiste en una lista de comprobación compuesta por 27 puntos y cuatro diagramas de flujo que los autores deben contrastar con sus revisiones sistemáticas y meta-análisis; su objetivo es ayudar a mejorar el informe y comunicación de este tipo de estudios. Está enfocada a las revisiones de ensayos clínicos aleatorizados, pero también puede aplicarse en otro tipo de investigaciones, particularmente en la evaluación de intervenciones (Moher et al., 2009).

Revisión sistemática y meta-análisis en la evaluación de estrategias de vigilancia y control:

La metodología descrita anteriormente ha demostrado ser de gran utilidad en la evaluación de estrategias de vigilancia y control en sanidad animal (Sargeant et al., 2014). En este campo de investigación se generan grandes volúmenes de información, en gran parte gracias a los programas oficiales de control y erradicación de enfermedades animales (muchas de ellas, zoonosis), y también a los ensayos experimentales que, sin descuidar los aspectos éticos y el bienestar animal, son más factibles en animales que en humanos. Esta metodología permite integrar esta información de una manera relativamente objetiva, y tiene por tanto un gran potencial.

Por ello la aproximación basada en revisión sistemática y meta-análisis se ha utilizado con el fin de evaluar la efectividad de estrategias tanto para el control de enfermedades y mejora del bienestar animal como para la mejora de la producción (Batorek et al., 2012; Knapp et al., 2014). Como ejemplos de la primera aplicación pueden encontrarse revisiones sistemáticas y meta-análisis sobre estrategias de manejo de poblaciones cinegéticas (Uehlinger et al., 2016), salvajes (Hartway and Mills, 2012) y de producción (Adkin et al., 2006; Sargeant et al., 2007; Dufour et al., 2011; Wilhelm et al., 2012; Lambton et al., 2013); evaluaciones de estrategias de vacunación contra virus (Hsu et al., 2010; Halasa et al., 2011; Cai et al., 2014; da Silva et al., 2014; Newcomer et al., 2015;

Theurer et al., 2015; Newcomer et al., 2017; Villanueva-Cabezas et al., 2017), bacterias (Jensen et al., 2002; Denagamage et al., 2007; Burns and O'Connor, 2008; Kristensen et al., 2011; Larson and Step, 2012; Todd et al., 2013; Varela et al., 2013; Vogstad et al., 2013; O'Neill et al., 2014; Kashangura et al., 2015; Carvalho et al., 2016) y parásitos (Baltzell et al., 2013; Wylie et al., 2014) en diferentes hospedadores animales, tanto de compañía y de producción como salvajes; y también de aspectos más concretos de una estrategia como la cobertura vacunal en áreas muy diversas (Davlin and Vonville, 2012; Jibat et al., 2015) o la eficacia de tratamientos basados en la administración de diversos antibióticos (Thomas and Elliott, 2013), probióticos (Thomas and Elliott, 2013), y prebióticos u otros (Sales, 2013), de control de vectores (Lima et al., 2015; Bouzid et al., 2016), así como de sistemas de detección temprana de enfermedades (Rodríguez-Prieto et al., 2015) y la evaluación económica de ciertas estrategias (Pinior et al., 2017).

3.1.2.3.2. Árboles de decisión en el análisis de escenarios

Un árbol de decisión es un gráfico auto dirigido cuyo fin es dividir un problema complejo en sus diferentes componentes en una secuencia lógica y temporal con el objetivo de facilitar su comprensión y la identificación tanto de sus características más importantes como de las relaciones entre sus diferentes componentes, para así facilitar la toma de decisiones en condiciones de incertidumbre (Weinstein, 1980).

El uso de árboles de decisión es una de las estrategias más robustas y eficientes en la exploración de datos y puede ser empleada en todo tipo de investigaciones (Berzal et al., 2003; Wu et al., 2008; Katz et al., 2014). Comparado con otras técnicas de reconocimiento de patrones y de clasificación, el árbol de decisión presenta la ventaja de la sencilla interpretabilidad del modelo construido (J. Myles et al., 2004), además de ser más rápido y aportar mayor precisión (Ahmed et al., 2018).

El uso de árboles de decisión tuvo su origen en las ciencias sociales con los trabajos de Morgan y Sonquist (Morgan, 1964) y de Morgan y Messenger (Morgan, 1973). A medida que se desarrollaban nuevos algoritmos para la

adaptación de los árboles al análisis de diferentes tipos de información se reconocía su utilidad y se extendía su uso, como sucedió en las comunidades del *Machine Learning* (Michalski, 1973a, b, 1983; Quinlan, 1983) y del *Pattern Recognition* (Henrichon, 1969), sub-áreas pertenecientes a las ciencias de computación y de la ingeniería eléctrica, respectivamente. Posteriormente se extendería su uso a otras áreas, entre ellas la sanidad animal; en concreto, el primer ejemplo corresponde al trabajo de los investigadores Carpenter y Norman (Carpenter and Norman, 1983), cuyo objetivo era la evaluación de la idoneidad de la monitorización de los perfiles metabólicos y celulares como predictores del rendimiento del parto en vacas.

En la literatura científica puede observarse como los términos árbol de decisión y árbol de escenario se usan indistintamente con el mismo fin. Ambos son métodos de análisis de riesgo cuantitativo, cuyo objetivo es la cuantificación de la probabilidad de que tenga lugar un determinado evento y la magnitud de sus consecuencias (Silva et al., 1995); sin embargo, es con la optimización de las decisiones basadas en árboles de escenario cómo se obtienen los árboles de decisión, de los cuales puede deducirse qué hacer en un camino específico del escenario (Silva et al., 1995).

El modelo:

Un árbol de decisión es un modelo jerárquico compuesto por ramas (de ahí su nombre) y de funciones discriminatorias, o reglas de decisión, que se aplican repetidamente para dividir el escenario en sub-espacios puros (J. Myles et al., 2004). Lo primero que ha de establecerse en la formulación del modelo es la pregunta de investigación y el escenario de estudio; de acuerdo a éstos se diseñará un árbol en concreto, representando cada uno de los factores que determinan la respuesta. Los elementos que componen el árbol de decisión son un nodo "raíz", representado en el gráfico como el nodo hacia el que ningún otro nodo apunta (nodo 1 en la Figura 20), y que representa el punto de partida del escenario; los nodos internos, que son aquellos hacia los que apuntan otros nodos y que, a su vez, apuntan a otros (nodo 2 en la Figura 20), y que representan los diferentes eventos intermedios; los nodos "hojas",

aquellos hacia los que apuntan otros nodos pero en los que terminan las rutas dado que no están conectados a otros nodos posteriores (nodos 3, 4 y 5 en la Figura 20), y que representan los posibles desenlaces o resultados del proceso representado; y las ramas, que son las líneas que conectan nodos sucesivos entre sí y que conforman los caminos que definen las diferentes decisiones. Cuando un nodo apunta a otros nodos en el árbol, estos últimos son sus nodos “descendientes inmediatos” (los nodos 4 y 5 son los descendientes inmediatos del nodo 2 en la Figura 20). Todos los nodos descritos anteriormente pueden ser nodos de probabilidad que indican la probabilidad de ocurrencia de un evento en ese punto, o bien nodos de decisión que indican que una decisión ha de tomarse en ese punto del proceso. Los árboles de escenario cuentan únicamente con nodos de probabilidad, mientras que los árboles de decisión combinan nodos de probabilidad con nodos de decisión. La bifurcación (ya sea a través de una decisión o como resultado de un evento aleatorio) en uno de los nodos conectado con varios descendientes inmediatos se realiza a partir del “atributo de división”, que tiene un valor asociado (“valor de la división”) que determina hacia qué descendiente inmediato se dirigirá el *objeto de interés* (por ejemplo, la probabilidad p a favor de uno de los descendientes inmediatos y la probabilidad $1-p$ a favor del otro). La “clase” se define como el atributo cuyos valores son objeto de predicción durante el proceso de clasificación (Katz et al., 2014).

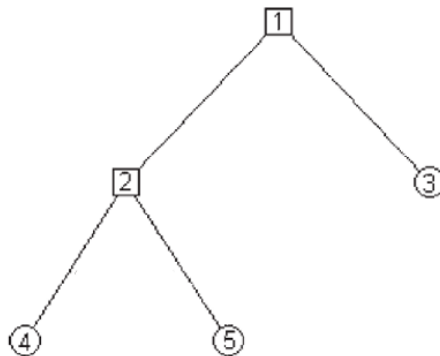


Figura 20. Ejemplo de árbol de decisión (extraído de Myles et al., 2004).

Durante el proceso de clasificación, el *objeto de interés* se desplaza desde la raíz hacia una de las hojas, punto donde la clasificación se hace efectiva (Katz et al., 2014). Esta clasificación puede tener como única posibilidad una de las clases (un camino), pero generalmente está condicionada por un conjunto de probabilidades (una probabilidad para cada uno de los caminos). Estas incertidumbres (probabilidades) determinan la transición a lo largo de las ramas alternativas (y excluyentes entre sí), y la probabilidad de alcanzar un resultado específico está sujeta a la multiplicación secuencial de las probabilidades que se suceden desde la raíz hasta el punto final a lo largo de ese camino (Rokach, 2015).

Extrapolando lo anterior a una población y problema concreto, como el que plantean Martin y colaboradores (Martin et al., 2007a), el árbol adoptaría un aspecto similar al representado en la Figura 21.

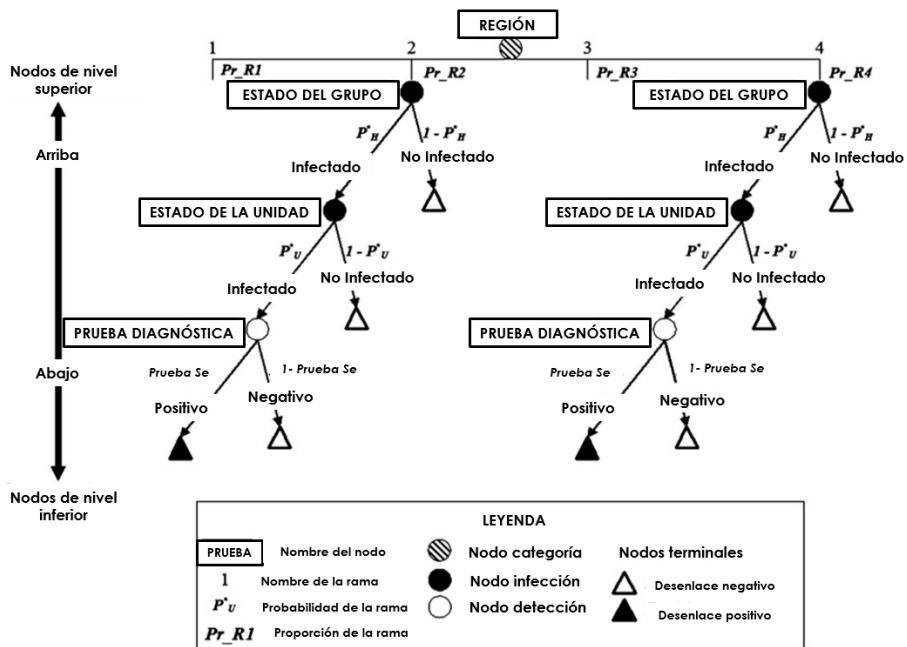


Figura 21. Árbol de escenario representando la vigilancia en matadero de la peste porcina clásica en Dinamarca (adaptado de Martin et al., 2007a).

Como puede observarse en la Figura 21, el árbol divide a la población en pequeños grupos, representando tanto la estructura de la población como todos los eventos que pretenden capturarse en ese escenario concreto. Así, en cada camino del árbol se estiman las probabilidades para cada resultado posible.

El objetivo del trabajo de Martin y colaboradores (Martin et al., 2007a) era evaluar la sensibilidad de los componentes de un sistema de vigilancia, definida como la probabilidad de observar al menos un reactor a las diferentes pruebas diagnósticas empleadas en una población que esté verdaderamente infectada (Dufour et al., 2001). Por tanto, los nodos del árbol recogido en la Figura 21 representan todos los posibles eventos que influyen en la probabilidad de que una enfermedad o agente infeccioso, en caso de que esté presente, sea detectado por el sistema de vigilancia. En este supuesto los animales dentro de cada grupo infectado tendrían la misma probabilidad de ser detectados como infectados dado que se asume un riesgo de enfermedad homogéneo. Por otro lado, el árbol asigna diferentes probabilidades de infección a diferentes secciones de la población (por ejemplo, Pr_{R2} vs Pr_{R4} en la Figura 21), capturando así la variabilidad en el riesgo de infección.

En el caso más sencillo, la estimación de la sensibilidad del sistema de vigilancia se lleva a cabo multiplicando todas las probabilidades a lo largo de uno de los caminos, y sumando aquellos que presentan un desenlace positivo (infección detectada) (Hueston, 2000; Cannon, 2002; Martin et al., 2007a); la multiplicación sucesiva de las probabilidades es un procedimiento aplicable a cualquier tipo de árbol. A diferencia del cálculo de la sensibilidad de una prueba diagnóstica en un animal, donde la presencia de enfermedad es una variable dicotómica, la sensibilidad de un sistema de vigilancia aplicado a una población depende del nivel de enfermedad en esa población (prevalencia) (Cannon, 2002). La sensibilidad de dos sistemas diferentes de vigilancia puede compararse mediante la razón entre ambas sensibilidades (el ratio de sensibilidad), al igual que podría realizarse con otro tipo de respuesta (por ejemplo, la comparación de la reducción de prevalencia obtenida aplicando

la *estrategia de control A vs la B*). Este estadístico puede emplearse para la comparación directa de la eficacia de los sistemas de vigilancia o de cualquier otra medida o tratamiento, para la planificación y el análisis económico.

Hay determinadas cuestiones que han de tenerse en cuenta a la hora de construir un árbol de escenario o un árbol de decisión (Martin et al., 2007a):

- El ámbito del modelo: Es importante definir claramente si el modelo considera enfermedad o infección, qué agente o síndrome recoge y la población que representa.
- La unidad de análisis para la cual se generan los resultados: una muestra, una muestra agrupada, un animal, un grupo de animales, un lote, una explotación, etc. Para cada unidad definida en el árbol se registra un resultado final, y cada resultado final del proceso es solo aplicable a esa unidad. También ha de tenerse en cuenta la cobertura y representatividad de la población de referencia para determinar si es posible la extrapolación de los resultados.
- El periodo de tiempo real al que equivale cada análisis, que a su vez estará condicionado por la epidemiología de la enfermedad en estudio y el tiempo que abarca el proceso representado.
- El evento de interés (por ejemplo, el resultado positivo o negativo en una prueba diagnóstica) y su interpretación (qué significado tiene un positivo en función de la diana de la prueba: anticuerpos, ADN, etc.).
- Los tipos de nodos: nodo de infección, que definen el estado de infección de un grupo y del que parten dos ramas (infectado y no infectado) cuyas probabilidades derivan de la prevalencia *pre-test*; nodo de detección, que representa cualquier evento, acción, elección, procedimiento o prueba que contribuye a la detección de una unidad infectada y del que parten dos ramas con las probabilidades de resultado positivo y negativo; nodo categoría, que define la categoría en la que recae cada grupo (sexo, edad, aptitud, región geográfica, etc.) y que contribuye a la descripción con exactitud del proceso [éste puede ser nodo categoría de riesgo (por ejemplo, procedencia de una región de alta prevalencia) o

nodo categoría de detección (por ejemplo, explotación sometida a controles mensuales), del que parten dos o más ramas dentro de las cuales cada grupo es homogéneo en términos de riesgo de infección o probabilidad de detección, respectivamente].

- El orden de los nodos: las probabilidades de cada nodo del árbol están condicionadas por las anteriores probabilidades de esa rama en concreto, por lo que deben estar posicionados en orden cronológico, en orden decreciente de tamaño de unidad y de modo que los nodos de infección sean anteriores a los nodos de detección.
- La estimación de las probabilidades que acompañan a las ramas: cada rama que parte de un nodo debe tener asignada una probabilidad o proporción; estas probabilidades pueden definirse de forma cualitativas, semi-cuantitativa o cuantitativa, existiendo diferentes métodos para su cálculo (AFFA, 2001). El análisis de árboles de escenario y decisión requiere de la estimación de numerosas probabilidades de ramas, y es conveniente la incorporación de una incertidumbre asociada a cada una de estas estimaciones, proceso que puede lograrse mediante la aplicación de la simulación estocástica. Para que los resultados del modelo sean lo más fiables y válidos posible las probabilidades que acompañan a las ramas deben estimarse empleando datos reales, siempre que sea posible. En caso de que no estén disponibles datos adecuados estas probabilidades pueden definirse a partir de la opinión de expertos (Stärk, 2000; Vose, 2000; Clemen, 2006).
- La prevalencia *pre-test* (proyectada): define las probabilidades que acompañan a las ramas que parten de los nodos de infección. Este valor juega un papel muy importante en el modelo y es el investigador quien establece su valor para cada unidad de estudio o clúster de unidades.

La construcción de árboles de decisión se puede llevar a cabo con diversos programas, de entre los cuales los más ampliamente utilizados son los siguientes: R (www.r-project.org) (Zhang, 2016); Matlab® (www.mathworks.com); la herramienta *Decision Tree* (Palisade Co, USA), y cuya simulación se puede complementar con @RISK (Palisade); y el programa

especializado en árboles de decisión *TreeAge Pro* (TreeAge Software, Williamstown, MA; www.treeage.com).

En los programas anteriores, el investigador determina el número de simulaciones (iteraciones) en base a la precisión deseada de la estimación, determinada por la amplitud de su intervalo de incertidumbre del 95% (valores correspondientes a los percentiles 2,5 y 97,5).

Ventajas y desventajas, aplicaciones:

Una de las ventajas principales de los árboles de decisión es su aplicabilidad independientemente de la naturaleza de las variables explicativas, además de estar basados en una técnica no paramétrica que tiene en cuenta las interacciones que pueden existir entre los datos, que es intuitiva y computacionalmente rápida. Por estos motivos existe la posibilidad de aplicación de los árboles de decisión en múltiples áreas de investigación, entre ellas el ámbito de la farmacología y la toxicología, especialmente en la evaluación de la relación dosis-toxicidad (Cramer et al., 1978; Gad, 1982; Gad et al., 1984; Alden, 1985; Bach and Bridges, 1985; Wimbish et al., 1991; Lorenz, 1992; Penninks, 1993; Poulsen, 1993; Boschert et al., 1996; Metcalfe et al., 1996; Munro et al., 1996; Braue, 1999; Kobayashi, 2001; Thybaud et al., 2007; Munro et al., 2008; Dureja et al., 2009), en la identificación de carcinógenos y en la evaluación de su riesgo potencial (Chu et al., 1981; Ashby, 1983; Richter-Reichhelm, 1989; Butterworth et al., 1995; Butterworth and Eldridge, 1995; Tennant et al., 1995; Lorge et al., 2007), en la evaluación de modelos alternativos al modelo animal para la realización de pruebas de seguridad de medicamentos y cosméticos (Macfarlane et al., 2009; McNamee et al., 2009; Pfuhler et al., 2010), en neurofisiología (Blackburn and Sachs, 1989; Masseroli et al., 1993; Toledo-Rodriguez et al., 2005), en el estudio de la epidemiología de enfermedades (Martins-Bede et al., 2010), en el diagnóstico y control de enfermedades (Mohammed et al., 1994; Lutumba et al., 2005; Odiit et al., 2005; Lubell et al., 2008; Uzochukwu et al., 2009; Li et al., 2016; Sui et al., 2016; Freeman et al., 2017; Jaegger et al., 2017), en la valoración coste-eficacia de tratamientos alternativos (Price et al., 2006; Gur and Schneeweiss, 2009; Hamza

et al., 2016; Maskery et al., 2016), en biología molecular y genética (Shoudai et al., 1995; Kel-Margoulis et al., 2002; Estrada-Gil et al., 2007; Sharifi et al., 2018), en seguridad alimentaria (Pariza and Johnson, 2001; Bindslev-Jensen et al., 2003; Schilter et al., 2003; Pedersen et al., 2004; WHO, 2009), en ecología (de Kock et al., 2003; De Kock and Wolmarans, 2005; Sweeney et al., 2006; Pesch et al., 2008; Davidson et al., 2009; Wilkes et al., 2009; Goetz et al., 2010; Sallam et al., 2017) y en ciencias ambientales (Yan et al., 2003; Grindon et al., 2006), entre otras.

En sanidad animal en particular se ha empleado esta aproximación en investigaciones con objetivos muy dispares, simulando lo que ocurriría en poblaciones hipotéticas (pero con características acordes a datos reales extraídos de programas de erradicación u otros) si ciertas medidas de control u otras eventualidades tuvieran lugar, y con un importante protagonismo de la valoración económica de dichas posibilidades. Las enfermedades que afectan al ganado de manera subclínica pueden tener un importante impacto económico, y por tanto el manejo de la producción involucra generalmente decisiones en relación con la inversión económica en medidas preventivas, además de, evidentemente, el tratamiento de animales enfermos (Marsh, 1999). Pero, al igual que el resultado de la medida de control o del tratamiento es incierto, también puede serlo su rendimiento en términos económicos.

A continuación, se presentan ejemplos de la aplicación de esta técnica analítica en el campo de la sanidad animal en función del objetivo del análisis.

Evaluación de estrategias de control:

Los árboles de decisión han sido ampliamente aplicados en sanidad animal para la evaluación de estrategias de control, y entre los ejemplos se encuentran los trabajos de Rat-Aspert y Fourichon e Isoda y colaboradores, centrados en el control de la diarrea viral bovina. En el primero (Rat-Aspert and Fourichon, 2010), se evaluó la efectividad en términos de reducción de prevalencia de la vacunación (voluntaria o con incentivos) en lugar de la compensación económica a los ganaderos por pérdidas por enfermedad,

concluyendo que esta última medida era la menos efectiva de las tres. En el segundo trabajo (Isoda et al., 2017) los investigadores emplearon árboles de escenario para la evaluación de las diferentes estrategias de control de la enfermedad establecidas en Japón: vacunación masiva, análisis individual previo a la salida a pastos comunales, chequeo de los rebaños mediante el análisis de muestras de leche e investigaciones de nuevos brotes; los autores determinaron que la vacunación masiva disminuía el número de animales infectados no detectados y también el número de animales necesario a someter al análisis individual previo a la salida a pastos (hasta una cobertura del 20% del rebaño), alcanzándose una sensibilidad en el sistema similar a la obtenida cuando se analizaba el rebaño por completo en ausencia de vacuna.

Se ha recomendado el uso de árboles de decisión en el análisis del coste-beneficio de campañas de control de enfermedades en animales de producción, disciplina en que esta técnica ha probado también su utilidad (Erb, 1988; Marsh, 1999). En el terreno de la producción bovina pueden encontrarse numerosos ejemplos de su aplicación entre los que se encuentra el estudio de Collins y Morgan (Collins and Morgan, 1991), donde se valoró mediante un árbol de decisión la utilidad del análisis y sacrificio de animales positivos como programa de control de la paratuberculosis; también, el trabajo de Tomassen y colaboradores (Tomassen et al., 2002), quienes desarrollaron un árbol de decisión para facilitar la toma de decisiones sobre qué medidas de control establecer en los primeros días sucesivos a la declaración de un brote de fiebre aftosa con el fin primordial de reducir el coste directo y las pérdidas de exportación, concluyendo que la vacunación de toda la cabaña ganadera en un radio de 3km alrededor de la zona cero era la estrategia más eficiente en áreas con alta densidad de explotaciones; la investigación de Berry y colaboradores (Berry et al., 2004), donde se evaluó la diferencia en coste-beneficio entre el tratamiento con antibiótico o el sellado interno del pezón para prevenir nuevas infecciones intra-mamarias en vacas secas; el trabajo de Reichel y Ellis, quienes construyeron un árbol de decisión para evaluar, de entre cuatro posibles estrategias de control de la infección por *Neospora caninum* en ganado vacuno de Nueva Zelanda y

Australia, cuál era la óptima desde el punto de vista económico (Reichel and Ellis, 2006); o el estudio de Reichel y colaboradores (Reichel et al., 2008), cuyo objetivo era valorar si el control de la diarrea viral bovina en el sector lácteo neozelandés compensaba económicamente, determinando que la implantación de cualquiera de las medidas propuestas (vacunación, testeo y sacrificio, mejoras en bioseguridad) conllevaba un ahorro considerable. En lo que respecta a la producción porcina, y especialmente en el control de enfermedades virales, figuran trabajos como el de Gardner y colaboradores (Gardner et al., 1996), quienes emplearon esta aproximación analítica para valorar la eficiencia de la vacunación junto con pruebas diagnósticas alternativas para el control del fallo reproductivo debido a la infección por parvovirus; o el estudio de Rodrigues y colaboradores (Rodrigues et al., 1990), quienes llevaron a cabo un análisis financiero de las estrategias de control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en la producción porcina estadounidense. También se han aplicado los árboles de decisión con este mismo objetivo en otros sectores productivos como el ovino, como refleja la publicación de Carpenter y colaboradores (Carpenter et al., 1987), en la que se determinó que la monitorización de las ovejas por medio de palpación, análisis de semen y serología (ELISA) y el sacrificio de los positivos era la estrategia óptima desde un punto de vista económico para el control de *Brucella ovis* en explotaciones de ovino de Estados Unidos, siendo superior a la vacunación. En el sector avícola se han utilizado árboles de decisión para cuantificar el posible beneficio económico derivado de la reducción de la incidencia de gripe aviar mediante vacunación y otras medidas de control en Nigeria y otros países con infraestructuras veterinarias y sistemas de producción similares (Fasina et al., 2007). En el sector equino también se ha aplicado esta técnica para determinar el coste-beneficio de la vacunación como estrategia de control de la ehrlichiosis monocítica equina en el estado de Nueva York, concluyéndose que ésta únicamente compensaba cuando la densidad de incidencia anual superaba los 12 casos por 1.000 caballo (Atwill and Mohammed, 1996).

Evaluación de estrategias de vigilancia:

Un campo en el que los árboles de escenario han sido aplicados también de forma extensa es la vigilancia de enfermedades animales, ya que este método posibilita la cuantificación de la sensibilidad de los diferentes componentes del sistema de acuerdo a un muestreo probabilístico (Martin et al., 2007a). Su utilidad ha quedado reflejada en numerosas investigaciones realizadas sobre el ganado bovino. Entre ellas se encuentra la investigación de Chengat Prakashbabu y colaboradores, quienes llevaron a cabo una comparación de la eficiencia basada en "vigilancia según riesgo" (*risk-based surveillance*) de *Taenia saginata* en vacuno en matadero y el sistema actual de inspección; el modelo propuesto consistía en una inspección centrada en el corazón (en detrimento del masetero) de animales seleccionados en función de sexo y edad y del historial de movimientos de la explotación de procedencia, dado que estos factores habían sido descritos como indicadores *a priori* de la presencia de quistes (Chengat Prakashbabu et al., 2018). Otro ejemplo es el trabajo de Hénaux y Calavas (Henaux and Calavas, 2017), donde se evaluó la eficiencia del sistema de vigilancia francés para la detección de brucelosis bovina y se comparó con 19 escenarios alternativos, concluyendo que los costes podían reducirse mediante la implantación de vigilancia clínica junto con el muestreo serológico "según-riesgo" de una muestra (20%) de la población, manteniendo la misma sensibilidad que el sistema actual. Otras temáticas abordadas mediante el uso de árboles de escenario para la vigilancia de enfermedades incluyen el caso de la lengua azul (serotipo 8) en Suiza, Bélgica, Francia y Holanda (Welby et al., 2016; Rüegg et al., 2018), la diarrea bovina viral en Dinamarca (Foddai et al., 2016) y el herpes bovino en granjas de leche europeas (Veldhuis et al., 2017).

En el caso del porcino también se han realizado numerosos trabajos basados en árboles de escenario para la vigilancia de enfermedades u otros problemas, como el de Alban y colaboradores (Alban et al., 2016) sobre vigilancia de residuos antibióticos en porcino en Dinamarca, o el estudio de Martin y colaboradores (Martin et al., 2007b), en el que se aplicó un árbol de escenario para la estimación de la sensibilidad del muestreo serológico en

matadero para la vigilancia de peste porcina clásica en Dinamarca. El modelo de Martin y colaboradores incorporaba el efecto de un muestreo según el riesgo de positividad asociado a la edad y la localización geográfica de la explotación, y la posible agrupación de la enfermedad dentro de cada explotación; como resultado obtuvieron una sensibilidad del sistema igual a 18%, 63% y 86% para una prevalencia de rebaño *pre-test* del 0,1%, 0,5% y 1%, respectivamente.

Los árboles de escenario se han aplicado también en otras especies animales de producción, como en el de Schulman y Lyytikäinen (Schulman and Lyytikäinen, 2018), quienes emplearon esta misma metodología con el fin de demostrar que la consideración de la distribución heterogénea de los genotipos que determinan una mayor susceptibilidad o resistencia a la tembladera ovina y un muestreo dirigido en base a tal característica aumentaría la sensibilidad del sistema de vigilancia de esta enfermedad, o el de Ojimekwe y colaboradores sobre vigilancia de la gripe aviar en Nigeria (Ojimekwe et al., 2016).

Al igual que el uso de los árboles de escenario es útil en estudios llevados a cabo en cualquier especie de abasto, también son aplicables en el caso de la fauna salvaje, y como ejemplo se encuentran los trabajos de Rivière y colaboradores. Estos investigadores llevaron a cabo la evaluación de la sensibilidad del sistema establecido en Francia para la vigilancia de tuberculosis bovina (bTB) en fauna salvaje (Rivière et al., 2015), en el que se integran el examen de carcasas de especies de caza, la vigilancia pasiva de animales hallados muertos o moribundos y el muestreo activo de jabalíes y tejones, y cuya aplicación depende del riesgo de bTB de la región. Concluyeron que la primera y tercera medida eran las que con mayor probabilidad detectarían al menos un animal infectado (dada una cierta prevalencia *pre-test*) y que la concienciación de los cazadores afectaba a dicha sensibilidad. Dos años después, completaron estos resultados con un análisis económico (Rivière et al., 2017), observando que la eficiencia del sistema era superior en áreas de alto riesgo debido a la mayor probabilidad

de detección de la infección y que la vigilancia activa de jabalíes y tejones continuaba siendo el componente más eficiente del sistema.

Evaluación de tratamientos:

Los árboles de decisión han sido utilizados frecuentemente como herramienta para ayudar en la toma de decisiones en el ámbito clínico, como la evaluación de tratamientos de enfermedades infecciosas (McDougall et al., 2018) y de diversas patologías; por ejemplo se han utilizado en perros con el fin de decidir la mejor aproximación para abordar los casos de criptorquidia (Bosch et al., 1989) , y para determinar la eficiencia de la gastropexia profiláctica en perros con riesgo de dilatación gástrica (Ward et al., 2003); en ganado vacuno, para comparar posibles intervenciones en casos de desplazamiento del abomaso (LDA) en vacas lecheras, siendo el tratamiento quirúrgico la elección favorecida frente a la venta del animal en cuestión (Ruegg and Carpenter, 1989); o en caballos, para decidir entre el tratamiento farmacológico o el quirúrgico en caballos con dolor abdominal (Ducharme et al., 1989).

Evaluación de pruebas:

La valoración de pruebas, tanto diagnósticas como indicadoras de riesgo o de producción, también ha sido objeto de estudio mediante el uso de árboles de decisión. Como ejemplo figura la primera investigación en el terreno de la sanidad animal donde fue aplicado un árbol de decisión: en esta investigación la idoneidad de la monitorización de los perfiles metabólicos y celulares como predictores del rendimiento del parto en vacas fue el objeto de estudio, siendo el resultado desfavorable sobre su posible uso (Carpenter and Norman, 1983). En torno a esta misma cuestión, el desarrollo de indicadores de producción en el sector vacuno, se encuentran otros trabajos como el de Mohammed y colaboradores (Mohammed et al., 1990), quienes llevaron a cabo una valoración coste-fiabilidad de tres pruebas diferentes para la detección del celo en vacas lecheras mediante la aplicación de un árbol de decisión, o el estudio de Pitcher y Galligan, cuyo objeto de evaluación fue un test rápido de análisis de progesterona en leche para una

detección temprana del estado de gestación en vacas (Pitcher and Galligan, 1990). Y en lo que a diagnóstico de enfermedades en vacuno se refiere, Saegerman y colaboradores (Saegerman et al., 2004) aplicaron árboles de decisión con el fin de identificar marcadores relevantes para la clasificación de casos sospechosos de encefalopatía espongiforme en ganado bovino en Bélgica, permitiendo el desarrollo de herramientas que apoyaran la toma de decisiones en ámbito clínico. Asimismo, pueden encontrarse ejemplos en otros sectores como el avícola, con la investigación de Lira y colaboradores (Lira et al., 2010) sobre la eficiencia de la combinación de diferentes pruebas para la detección y aislamiento de virus de gripe aviar a partir de hisopos cloacales de aves salvajes, o la publicación de Bisailon y colaboradores (Bisailon et al., 2001) que refleja la utilidad de los árboles de decisión en la clasificación de anomalías graves en pollos sacrificados en mataderos de Canadá con el determinar cuáles representaban un riesgo potencial para el consumidor. En el terreno de la producción ovina, Dawson y colaboradores (Dawson et al., 2005) evaluaron la capacidad diagnóstica de la citología de fluido broncoalveolar para la determinación de enfermedades pulmonares en ovejas mediante un árbol de decisión; mientras que en el sector equino, Waggett y colaboradores (Waggett et al., 2010) emplearon esta misma aproximación para analizar la idoneidad de la sinaptofisina como marcador inmunohistoquímico de la disautonomía equina, concluyendo que era una buena alternativa diagnóstica para esta enfermedad.

Otras aplicaciones:

También se ha empleado esta metodología para el estudio epidemiológico de enfermedades y en el análisis de riesgo, por ejemplo, en la determinación de la probabilidad de propagación de la gripe aviar de baja y alta patogenicidad dentro y entre diferentes tipos de explotaciones comerciales de pollos en Australia tras la exposición de un único pollo al virus (Scott et al., 2018).

A pesar de todo lo anterior, los árboles de decisión también presentan ciertas desventajas; además de que las reglas de asignación son muy sensibles a

pequeñas perturbaciones en los datos, la elección del árbol óptimo es difícil y es necesario un gran número de datos para asegurar que la cantidad de observaciones en los nodos hoja sea significativa.

4. OBJETIVOS

En el presente trabajo de investigación se ha explorado la utilidad de la aplicación de técnicas de análisis cuantitativo para el estudio de la epidemiología de enfermedades de relevancia en sanidad animal y salud pública, y, más concretamente, para la evaluación de la capacidad diagnóstica de diferentes pruebas, el estudio de la dinámica espacial de enfermedades animales y la monitorización de estrategias de control de diferentes zoonosis. Así, se han definido los siguientes objetivos:

4.1 Objetivo I: Aplicación de la estadística Bayesiana para la evaluación de pruebas diagnósticas en ausencia de pruebas de referencia (*gold standard*).

La mayor parte de estudios epidemiológicos se fundamentan en la clasificación de los individuos de la población en las categorías de infectado (enfermo) y no infectado (susceptible) en función de los resultados de una prueba diagnóstica, pero con frecuencia la fiabilidad de esa prueba diagnóstica no se evalúa o se asume en función de estudios previos basados en supuestos que no tienen por qué ser aplicables al contexto en el que se utilizan posteriormente. Varios estudios llevados a cabo en la última década han confirmado la utilidad de la estadística Bayesiana para estimar la capacidad diagnóstica de estas pruebas en situaciones de campo en ausencia de un test de referencia, si bien su uso en sanidad animal es aun relativamente escaso.

Sea el caso de la introducción de una nueva prueba para el diagnóstico de una enfermedad endémica y ampliamente estudiada como es la tuberculosis bovina, o el del descubrimiento de un nuevo reservorio en el que se desconoce la fiabilidad de las pruebas tradicionales de diagnóstico como es

Objetivos

el caso de la leishmaniosis en lagomorfos, la aplicación de la estadística Bayesiana podría ayudar a evaluar su utilidad dada la ausencia de una prueba diagnóstica fiable de referencia.

Como parte del objetivo I se han desarrollado los siguientes estudios:

- Evaluación de la sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas (IFAT) y moleculares (PCR-directa) para el diagnóstico de leishmaniosis en lagomorfos mediante una aproximación bayesiana
- Evaluación de la fiabilidad del kit IDvet para la prueba del γ -IFN en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en España

4.2. Objetivo II: Aplicación de técnicas de análisis espacial para el estudio de enfermedades animales en zonas de alta prevalencia.

Una vez determinado el estado de un individuo/población en relación a la presencia de una enfermedad, es fundamental investigar la existencia de patrones espaciales, temporales o espaciotemporales en su distribución. En este contexto, el uso de sistemas de información geográfica (SIG) permite la visualización de la situación, y complementadas con herramientas de análisis espacial facilitan la identificación de clústeres de enfermedad, contribuyendo a focalizar los esfuerzos en esas áreas.

En España existe un programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina desde 1987 que ha resultado en un marcado descenso de la prevalencia; sin embargo, este éxito no ha sido uniforme. Por lo tanto, el empleo del análisis espacial puede ayudar a identificar estas áreas de especial incidencia y los factores que impiden el progreso del programa, además de aportar información sobre su dinámica de transmisión cuando se combina dicho análisis con la caracterización molecular. Esta aproximación analítica es de particular utilidad en áreas de alta prevalencia en las que

confluyen diversos factores de riesgo que dificultan la aplicación de estudios epidemiológicos más tradicionales.

Como parte del objetivo II se ha desarrollado el siguiente estudio:

- Dinámica espacial de la tuberculosis bovina en la Comunidad Autónoma de Madrid, España (2010-2012)

4.3. Objetivo III: Aplicación de herramientas cuantitativas para la monitorización de estrategias de vigilancia y control de enfermedades zoonóticas en el reservorio animal.

Dado que el objetivo último de los estudios epidemiológicos suele ser el permitir disminuir el riesgo de enfermedad, el siguiente paso es la integración de toda la información anterior para el diseño e implementación de estrategias de vigilancia y/o control. No obstante, es fundamental la evaluación continuada de la efectividad de dichas estrategias, aspecto que con frecuencia no recibe la suficiente atención. Dicha tarea puede ser abordada desde enfoques radicalmente diferentes entre sí en función de la información disponible. En aquellos casos en los que se han realizado estudios de diversa naturaleza con un objetivo común, la realización de una revisión sistemática que proporcione una visión global y objetiva de lo estudiado relativo a una estrategia concreta combinada con el meta-análisis para la obtención de estimaciones globales de su efectividad, resulta particularmente apropiada. En el extremo contrario en el que se apliquen estrategias en evolución, generando grandes volúmenes de información de forma rutinaria, el uso de modelos analíticos como los árboles de decisión que dividen el problema en cada uno de los elementos que lo componen pueden permitir su evaluación en condiciones de campo, contribuyendo además a identificar los factores que condicionan su efectividad.

Objetivos

Tanto la salmonelosis porcina como la tuberculosis bovina son zoonosis endémicas en nuestro país. Sobre la primera no existe un programa nacional de control, pero sí una gran inversión en estrategias para minimizar la prevalencia, normalmente aplicadas a nivel de granja. La vacunación es una de ellas, pero la gran heterogeneidad de vacunas y protocolos existentes dificultan extraer conclusiones definitivas sobre su efectividad en campo. Sin embargo, la tuberculosis bovina sí cuenta con un programa nacional aplicado en España desde 1987, si bien éste se apoya en la aplicación de distintas combinaciones de pruebas diagnósticas imperfectas (IDTB, prueba de IFN- γ , inspección en matadero, cultivo post-mortem) por lo que es difícil determinar la probabilidad de que las explotaciones estén libres de la infección tras la aplicación sucesiva de dichas pruebas, a pesar de la gran cantidad de información generada anualmente a través de la propia aplicación del programa.

Como parte del objetivo III se han desarrollado los siguientes estudios:

- Evaluación de la sensibilidad del Programa de Erradicación de la tuberculosis bovina en una región de alta prevalencia de España mediante un árbol de escenario
- La vacunación como estrategia de control de la infección por *Salmonella* en porcino: Revisión sistemática y meta-análisis de la literatura científica

5. OBJECTIVES

In the present thesis, the applicability of quantitative methods for the epidemiological study of diseases relevant in animal and public health has been evaluated and, specifically, their applicability in the evaluation of the performance of different diagnostic tests, in the study of the spatial dynamics of animal diseases and in monitoring control strategies for different zoonotic diseases. Therefore, the following objectives have been defined according to the previous points:

5.1. Objective I: Application of the Bayesian approach for the evaluation of diagnostic tests in the absence of a perfect reference test.

Most of epidemiological studies are based on the classification of individuals from a population in the infected (diseased) and non-infected (healthy) categories based on the results obtained in a diagnostic test, but often the accuracy of this test is not evaluated or is assumed to be in agreement with previous studies carried out in conditions that may be not applicable in the context the diagnostic test is applied thereafter. Several studies performed in the last decade have supported the utility of Bayesian statistics in estimating the diagnostic accuracy of these tests in field conditions in the absence of a gold standard, even though its application in animal health is still relatively scarce.

Whenever is the case of the introduction of a new test for the diagnosis of an endemic and widely studied disease as is bovine tuberculosis, or the discovery of a new reservoir in which the accuracy of traditional diagnostic tests is unknown as is leishmaniasis in lagomorphs, the application of Bayesian statistics

Objectives

could help in the task of evaluating the utility of these diagnostic tests since a perfect reference test is lacking.

Thus, as part of objective I, the following studies were carried out:

- Assessment of the sensitivity and specificity of serological (IFAT) and molecular (direct-PCR) techniques for diagnosis of leishmaniasis in lagomorphs using a Bayesian approach
- Evaluation of the performance of the IDvet IFN-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis in Spain

5.2. Objective II: Application of methods of spatial data analysis for the study of animal diseases in high prevalence areas.

Once resolved the disease status of an individual/population is essential to investigate the presence of spatial, temporal or spatiotemporal patterns in the distribution of the disease. In this context, the use of geographical information systems (GIS) allows the visualization of the situation, and supplemented with spatial analysis tools that ease the identification of disease clusters, contribute to focus control efforts in these areas.

In Spain, a national bovine tuberculosis (bTB) eradication program has been in place since 1987, resulting in a marked decrease of bTB prevalence; however, this success has not been uniform. Therefore, the application of spatial analysis can help to identify these areas of persistence of disease and the presence of factors impairing the progress of the eradication program, and may provide some insights of disease transmission dynamics when combined with molecular typing techniques. This analytical approach is especially useful when applied in high prevalence areas where several risk factors converge, fact that hinders the application of traditional epidemiological approaches.

As part of objective II, the following study was performed:

- Spatial Dynamics of Bovine Tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010-2012)

5.3. Objective III: Application of quantitative methods in monitoring surveillance and control strategies of zoonotic diseases in the animal reservoir.

Since the last goal of epidemiological studies is normally to allow diminish the disease risk, the following step is the integration of all the previous information in order to design and implement surveillance and/or control strategies. However, is essential the continuous evaluation of the efficacy of these strategies, aspect that frequently does not receive enough attention. This task can be addressed by different approaches according to the available information. In those cases where studies with different characteristics but a common goal have been carried out, the execution of a systematic review that provides a global and objective insight of all the evaluation studies of a control strategy, in combination with a meta-analysis in order to obtain pooled estimates of its efficacy, is an approach particularly appropriate. On the opposite side, where developing strategies are applied generating large amounts of information, the application of decision and/or scenario tree modelling, which disaggregates a complex problem into its different components, can help to evaluate these strategies in field conditions, as well as identifying the factors that may determine their efficacy.

Both, porcine salmonellosis and bovine tuberculosis are endemic diseases in Spain. For the former it does not exist a national control program but there is a big investment in strategies, usually applied in the pre-harvest phase, in order to reduce its prevalence. Vaccination is one of these strategies but the large heterogeneity in vaccines and vaccination protocols complicates concluding on its potential efficacy on the field. However, for bovine tuberculosis control there is a national program in Spain since 1987 although it is based on the application of different combinations of imperfect diagnostic tests (skin test,

Objectives

IFN-gamma assay, slaughterhouse inspection and post-mortem bacteriological analysis), what makes difficult to determine the likelihood of disease freedom in farms after the successive application of these diagnostic tests, despite the large amount of information generated annually through the campaign itself.

Thus, within this objective, the following studies were carried out:

- Assessment of the sensitivity of the bovine tuberculosis eradication program in a high prevalence region of Spain using scenario tree modeling
- Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature

6. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

6.1. Capítulo I

6.1.1. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas (IFAT) y moleculares (PCR-directa) para el diagnóstico de leishmaniosis en lagomorfos mediante una aproximación bayesiana

La leishmaniosis, causada por *Leishmania infantum*, es una zoonosis transmitida por vectores endémica en la cuenca mediterránea, donde el perro está considerado el principal reservorio doméstico. El brote de leishmaniosis humana acontecido en el suroeste de la Comunidad de Madrid, con inicio en julio de 2009, puso de manifiesto el papel potencial de los conejos y liebres como reservorios competentes del parásito. Sin embargo, es difícil estimar la prevalencia de *L. infantum* en lagomorfos debido a la gran incertidumbre que existe en torno a la fiabilidad de las pruebas diagnósticas tradicionales en estas especies, además de la falta de conocimiento sobre la patogénesis de la leishmaniosis en lagomorfos.

Por tanto, y con el fin de evaluar la fiabilidad de la inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT) y de la PCR-anidada sobre muestras de piel para el diagnóstico de *L. infantum* en lagomorfos, se empleó un modelo Bayesiano. Se recogieron muestras de 217 conejos y 70 liebres procedentes de dos áreas diferentes dentro de la Comunidad de Madrid y ajenas a la zona del brote. Para la proyección del modelo se consideró que las muestras pertenecían a dos poblaciones diferentes (conejos y liebres) y se asumió una independencia condicional de los resultados del IFAT y de la PCR en base a las diferencias en lo que a la diana diagnóstica de las pruebas respecta (detección de anticuerpos vs detección directa del ADN del parásito). Debido a la ausencia de información previa sobre la precisión de estas pruebas en

lagomorfos, la construcción de los *priors* de sensibilidad y especificidad de las pruebas se llevó a cabo en función de las evidencias obtenidas en otras especies, principalmente en el perro. Se emplearon dos puntos de corte alternativos para la interpretación de los resultados del IFAT: 1/50 para la interpretación conservadora (los dudosos se consideraron negativos) y 1/25 para la sensible (los dudosos se consideraron positivos).

Las estimaciones posteriores de la fiabilidad del IFAT estuvieron en consonancia con sus *priors*, con valores para su sensibilidad y especificidad en torno al 70-80%. Sin embargo, la mediana de la estimación posterior de la sensibilidad de la PCR se situó por debajo del 30% independientemente de cuál fuera la interpretación del IFAT, mientras que su especificidad fue alta. La prevalencia estimada fue sustancialmente superior en la población de conejos que en la de liebres.

Estos resultados demuestran la utilidad del IFAT como herramienta diagnóstica de *L. infantum* en lagomorfos. Por otro lado, la baja sensibilidad de la PCR podría explicarse por una carga parasitaria baja en la piel en el momento de la toma de la muestra. Estos resultados ayudarán al diseño e implementación de programas de vigilancia en fauna salvaje, cuyo objetivo final es la detección temprana y prevención de la irrupción de esta enfermedad en la población humana y de animales domésticos.

Original Article

Assessment of the sensitivity and specificity of serological (IFAT) and molecular (direct-PCR) techniques for diagnosis of leishmaniasis in lagomorphs using a Bayesian approach

María Luisa de la Cruz*, Andres Pérez[†], Mercedes Domínguez[‡], Inmaculada Moreno[‡], Nerea García*, Irene Martínez*, Alejandro Navarro*, Lucas Domínguez* and Julio Álvarez[†]

*Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Madrid, Spain, [†]Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA and [‡]Departamento de Inmunología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, 28220, Spain

Abstract

Leishmaniasis, caused by *Leishmania infantum*, is a vector-borne zoonotic disease that is endemic to the Mediterranean basin. The potential of rabbits and hares to serve as competent reservoirs for the disease has recently been demonstrated, although assessment of the importance of their role on disease dynamics is hampered by the absence of quantitative knowledge on the accuracy of diagnostic techniques in these species. A Bayesian latent-class model was used here to estimate the sensitivity and specificity of the Immunofluorescence antibody test (IFAT) in serum and a *Leishmania*-nested PCR (Ln-PCR) in skin for samples collected from 217 rabbits and 70 hares from two different populations in the region of Madrid, Spain. A two-population model, assuming conditional independence between test results and incorporating prior information on the performance of the tests in other animal species obtained from the literature, was used. Two alternative cut-off values were assumed for the interpretation of the IFAT results: 1/50 for conservative and 1/25 for sensitive interpretation. Results suggest that sensitivity and specificity of the IFAT were around 70–80%, whereas the Ln-PCR was highly specific (96%) but had a limited sensitivity (28.9% applying the conservative interpretation and 21.3% with the sensitive one). Prevalence was higher in the rabbit population (50.5% and 72.6%, for the conservative and sensitive interpretation, respectively) than in hares (6.7% and 13.2%). Our results demonstrate that the IFAT may be a useful screening tool for diagnosis of leishmaniasis in rabbits and hares. These results will help to design and implement surveillance programmes in wild species, with the ultimate objective of early detecting and preventing incursions of the disease into domestic and human populations.

Keywords: *Leishmania infantum*, Lagomorphs, Diagnosis, IFAT, Ln-PCR, Bayesian modelling.

Correspondence: Julio Álvarez, Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, 1365 Gortner Ave, St. Paul, MN 55108, USA. E-mail: jalvarez@umn.edu

Introduction

Leishmaniasis is a term that refers to a group of vector-borne diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*, affecting humans and other mammals (Banuls *et al.* 2007). Leishmaniasis is considered one of the most important neglected diseases and it remains endemic in at least 88 developing countries. In addition, it has recently gained attention due to its emergency in Central and Northern European

countries (Gramiccia & Gradoni 2005; Ready 2010). In the Mediterranean area, where leishmaniasis is endemic, *L. infantum* is the agent responsible for the disease (Boelaert *et al.* 2000), and sandflies of the genus *Phlebotomus* (*P. perniciosus* and *P. ariasi*) are the main vectors (Aransay *et al.* 2003; Franco *et al.* 2010; Galvez *et al.* 2011; Marofi *et al.* 2013), whereas dogs are considered the most important domestic reservoir in the region (Galvez *et al.* 2010; Gallego 2004). Other mammals that may be infected under

field conditions include black rats, horses (Solano-Gallego *et al.* 2003), cats (Martin-Sanchez *et al.* 2007), rabbits (Chitimia *et al.* 2011; Garcia *et al.* 2014; Moreno *et al.* 2014), hares (Molina *et al.* 2012; Moreno *et al.* 2014) and a number of wild carnivores (Criado-Fornelio *et al.* 2000; Millan *et al.* 2011; Sobrino *et al.* 2008).

A recent leishmaniasis outbreak in which 560 people were affected in the south-western area of the province of Madrid, Spain, (Arce *et al.* 2013; Jimenez *et al.* 2014; Gomez-Barroso *et al.* 2015) demonstrated the potential role that rabbits and hares may have as competent reservoirs for the disease. *L. infantum* infection was evidenced in the population of lagomorphs in the area of the outbreak using PCR and indirect immunofluorescence antibody test (IFAT), with up to 74.1% and 45.7% of seropositive hares and rabbits, respectively (Moreno *et al.* 2014). Another study carried out on an area of Madrid different from the region where the outbreak occurred revealed that 82.6% of the rabbits were positive to IFAT and/or PCR (Garcia *et al.* 2014), thus suggesting that the infection is prevalent in those species in that region. This finding may be important on the epidemiological dynamics of the disease given that rabbits and hares represent a large proportion of the mammalian biomass in Spain (Diaz-Saez *et al.* 2014).

There are a number of biological characteristics of lagomorphs that are consistent with their potential role as competent reservoirs for *L. infantum*. Rabbits and hares' life-cycle is longer than the parasite-transmission cycle. Furthermore, they are known to be a highly attractive blood source for *P. perniciosus* (Benito-De Martin *et al.* 1994; Jimenez *et al.* 2013). Absence of clinical signs in most, if not all, the infected population allow for the continuous exposure to the vector, thus allowing further transmission (Diaz-Saez *et al.* 2014). In addition, warrens of those species are a suitable biotope for the vector. Finally, there are experimental evidences demonstrating the ability of infected rabbits and hares to transmit *Leishmania* to a competent vector (*P. perniciosus*) (Jimenez *et al.* 2014; Molina *et al.* 2012).

Prevalence of *L. infantum* in the population of lagomorphs in infected settings is difficult to estimate due to the large uncertainties that exist on the

performance of diagnostic tests in these species. Serological tests have not been properly optimized and assessment of the performance of direct-PCR detection-based tests is impaired by the lack of knowledge regarding pathogenesis of the disease in lagomorphs. Accuracy of serodiagnosis may also be affected by the occurrence of serological cross reactions between this parasite and *Trypanosoma nubiasi* (Diaz-Saez *et al.* 2014), which is also prevalent in Spain.

On the other hand, sensitivities of DNA-based tests seem to be variable, depending on the choice of the target sequence, the sample analysed and the target population of the assay (i.e. detection of exposure vs. active infection) (Lachaud *et al.* 2002). Different samples can be used for molecular detection, but the sensitivity of the test will depend on the stage of infection (Paradies *et al.* 2010). For that reason, the criterion for selection of sampled individuals may lead to false negative results, impairing the test sensitivity. In addition, PCR may fail to amplify parasite DNA when it is present at a low load (Hitakarun *et al.* 2014).

To assess the performance of *Leishmania* diagnostic tests in lagomorphs, which is a prerequisite for the development of surveillance and control strategies, a latent-class analysis was performed on the IFAT and direct-PCR results obtained on 217 rabbit samples and 70 hare samples from two different populations in the region of Madrid, Spain. This information will help to design and implement prevention and control programmes for the disease in Spain, and other endemically infected regions worldwide.

Materials and methods

Study population

Sample size was estimated assuming an expected prevalence of 50%, an error of 6% and a 95% confidence level, and an infinite lagomorph population size (Thrusfield 2005). Samples were collected from two areas of the region of Madrid, in central Spain, referred to as Northwestern (NW) and Northeastern (NE) sampling areas. Because of differences in the population density and species distribution, sampling

was subsequently stratified, so that 75% and 25% of the samples were collected from rabbits in the NW and hares in the NE areas, respectively. Final sample sizes were 200 (rabbits, NW) and 67 (hares, NE), respectively. Finally, a total of 217 European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and 70 hares (*Lepus granatensis*) were captured using ferretting (Cowan 1984) and nets, respectively. Samples were obtained between September and November 2013. This experimental design was approved by the Health and Environment authorities of the Madrid Council.

Animals (rabbits and hares) were transported to the laboratory within the first 5 h following their capture, where they were anaesthetized with a blend of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (2.3 mg/kg) administered by intramuscular injection to ease the cardiac blood sampling. T61 (0.5 mL/animal) was then employed for their euthanasia and animals were necropsied to observe macroscopic lesions compatible with subclinical infections. In addition, information on the gender (determined by observing the external genitalia) and age (established based on the presence of cartilage conjunction in the ulna of the forelegs (Ballesteros 1998)) was collected in 192 (88.5%) of the 217 rabbits (55 male and 137 female, 72 young and 120 adult) and in 64 (91.4%) of the 70 hares (31 male and 33 female, 23 young and 41 adult).

Serum, skin (from the external ear) and spleen samples were collected from all animals for laboratory determinations. Sera were analysed using IFAT; the skin and the spleens were stored at -20°C for subsequent PCR analyses.

IFAT analysis

Rabbit and hare serum titres against *L. infantum* were obtained following procedures described elsewhere (Moreno *et al.* 2014). Briefly, 24-well glass slides coated with 2×10^5 *L. infantum* (MCAN/ES/97/10 445) zymodeme MON-1 grown for 5 *in vitro* passages were used. Serum samples (10 μL) were analysed by serial doubling dilution (1/25 to 1/100) in PBS and incubated for 30 min at 37°C . Slides were washed three times (10 min each) in PBS, and 10 μL of fluorescein-labelled goat anti-rabbit

immunoglobulin (4050-02; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) diluted in PBS supplemented with Evans blue (diluted $1/10^3$) were added to wells and incubated (37°C , 30 min). After incubation, slides were washed three times in PBS, mounted, and examined in a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 40; $40 \times$ magnification). To detect anti-*Leishmania* antibodies, a threshold value was established at 1/25 dilution (at this dilution, background antitypanosomatid reactivity due to natural antibodies was negligible) using sera from *Leishmania*-seronegative naïve NZW rabbits (Moreno *et al.* 2014). *L. infantum* promastigotes derived from various culture passages was used as the species-specific target antigen. For genus-specific antigen controls, low-passage *L. amazonensis* promastigotes were used in parallel.

Finally, results of the IFAT titres $\geq 1/50$ and $< 1/25$ were classified as positive and negative, respectively, as previously described (Moreno *et al.* 2014). A titre between 1/25 and 1/50 was assumed to be inconclusive and alternatively considered as negative ('conservative interpretation') or positive ('sensitive interpretation') in further analyses.

PCR analysis

DNA extraction: Approximately 25 mg of skin and 10 mg of spleen were placed in 300 μL of NET-10 buffer. DNA extraction was performed using the QIAamp Blood and Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the procedure recommended by the manufacturer. DNA was resuspended in 150 μL of elution buffer and frozen at -80°C until use. *Leishmania*-nested PCR (Ln-PCR): A specific *Leishmania*-nested PCR reaction aimed at the SSU-rRNA region (Cruz *et al.* 2002) was performed in all the skin samples. Negative (sterile water) and positive controls [DNA obtained from *L. infantum* (MCAN/ES/97/10 445) zymodeme MON-1 promastigotes] were used on each assay. Reactions were carried out in a C1000 Thermal Cycler BIORAD (Alcobendas, Madrid, Spain). PCR products were visualized in a 2% agarose (Ultrapure Agarose, Invitrogen) gel using DNA SYBR Safe gel stain (Invitrogen) and 5 μL loading marker (BIOTOOLS 100 bp Ladder Marker).

Statistical analysis

Proportions of positive samples to each technique and individual characteristics were compared using Pearson's Chi-square test. Agreement between the qualitative results recorded for both diagnostic techniques was measured using the kappa statistic, carried out with the SPSS software V. 20 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

A Bayesian latent-class model was used to estimate the sensitivity and specificity of the IFAT test and the Ln-PCR of skin samples considering that samples belonged to two different populations and results from both tests were conditionally independent (Gardner *et al.* 2000). This latter assumption was based on the very different principles underlying each technique (detection of specific antibodies vs. direct detection of DNA from the parasite). Still, the possible existence of conditional dependence was explored in a sensitivity analysis (Materials and methods, Statistical analysis).

Use of latent-class models to estimate diagnostic tests accuracy in the absence of a gold standard has been described elsewhere (Branscum *et al.* 2005; Gardner *et al.* 2000). Briefly, the value of parameters (sensitivity and specificity of each technique, prevalence) is jointly estimated (posterior probability) considering the uncertainty about the true value of those parameters (prior distributions) and the collected data. Given the lack of data about the performance of the tests in lagomorphs, evidences obtained in dogs and, to a lesser extent, in humans and cats, were used. Prior distributions for the sensitivity and specificity of the diagnostic tests were fitted using information obtained from the literature (Table S1) and expert opinion of two of the authors (D.M., M.L.). Sensitivity and specificity were assumed to be beta-distributed (Fig. 1, Table 2). Given the lack of information about the possible prevalence in the studied populations, we used a beta prior distribution (assuming a most likely value of 40% and 95% confidence it was below 80%) in agreement with results previously estimated for lagomorphs in a different area of the Madrid region (Moreno *et al.* 2014).

A sensitivity analysis was conducted to elucidate if the model was robust to the selection of priors. For the sensitivity analysis, non-informative 0 1 uniform

distributions were used alternatively as the prior for the sensitivity and specificity of each test and the expected prevalence. Model estimates obtained using the non-informative distribution for all five parameters were then compared with those obtained using the informative priors, and overlapping of 95% Bayesian posterior probability intervals (PPI) was considered indicative of model robustness. A model including the results of the Ln-PCR of both skin and spleen samples (parallel interpretation) was also run to try to improve the sensitivity of the test. Finally, an alternative model considering that tests were conditionally dependent was also evaluated.

All analyses were implemented in WinBugs 1.4.3 (Lunn *et al.* 2000). Three Markov chain Monte Carlo runs were performed to visually assess convergence and mixing. Convergence was also assessed by evaluating that the Gelman Rubin value was below 1.1 (Gelman & Rubin 1992). The mode of the prior distributions was used as the initial value for each estimated parameter in each chain and models were run for 14 500 iterations after discarding the first 500 burn-in for computing the posterior estimates, and autocorrelation was eliminated by thinning the samples by collecting one in 10 consecutive samples.

Results

Descriptive results

Two rabbits and one hare could not be sampled for PCR testing, and were therefore excluded from the analysis. From the remaining 284 animals, 215 were rabbits and 69 were hares. A total of 107 rabbits (49.8%) tested IFAT-positive, whereas 73 (34%) and 35 (16.3%) were negative and inconclusive, respectively. Proportion of reactors in the IFAT in the rabbit population therefore ranged from 49.8% to 66% when the conservative/sensitive interpretation was in place (Table 1 and Table S2). In contrast, only 26 rabbits (12.1%) tested positive in the Ln-PCR of skin samples. This number increased to 28 if results from both skin and spleen samples were considered in parallel.

The number of reactors was significantly ($P < 0.001$) lower in the hare population, with 12 (17.4%), 48 (69.6%) and 9 (13%) samples being

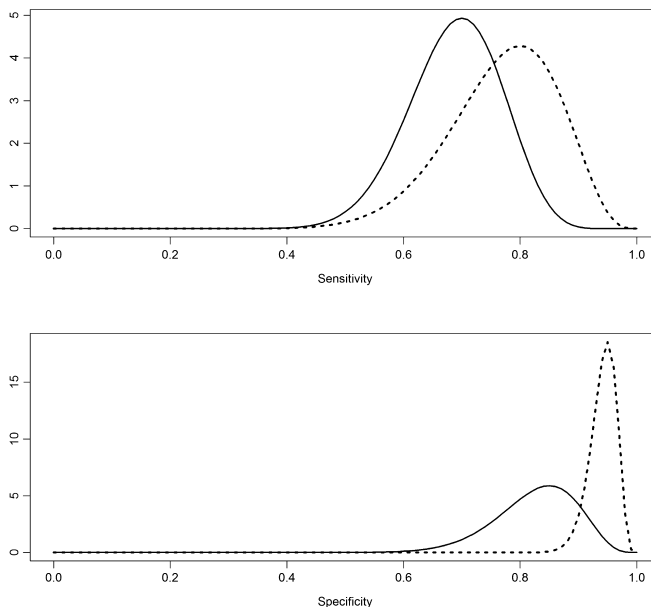


Fig. 1 Beta distributions used as priors for the sensitivity and specificity of the immunofluorescence antibody test (IFAT) (solid line) and skin Ln-PCR (dashed line) techniques.

Table 1. Number of reactors to the IFAT test and to the Ln-PCR (skin samples) performed on 215 rabbits and 69 hares in Madrid (Spain) for the combination of diagnostic tests and IFAT interpretation criteria

Species	Interpretation IFAT test	IFAT+/PCR+	IFAT+/PCR-	IFAT-/PCR+	IFAT-/PCR-
Rabbits	Conservative	16	91	10	98
	Sensitive	19	123	7	66
Hares	Conservative	0	12	1	56
	Sensitive	0	21	1	47

IFAT, immunofluorescence antibody test

positive, negative and inconclusive to the IFAT test, respectively, whereas only one skin sample tested positive to the Ln-PCR (Table 1 and Table S2).

No gross pathology compatible with disease was observed in any case. A significantly ($P < 0.001$) higher proportion of seropositive adults was

observed (74/159, 46.5%) compared with young animals (26/94, 27.7%). When considering Ln-PCR results, no significant differences depending on age and gender of the animals were detected.

Tests agreement was very low regardless the interpretation used in the IFAT test (Kappa = 0.076 using a conservative interpretation and 0.044 with the sensitive interpretation).

Model results

Using the two-population model, posterior estimates of the sensitivity of the IFAT test were in general higher than the prior used in the model, whereas the opposite was true for the specificity, but in both cases there was a large overlap between prior and posterior values, with both median posterior estimates >70% (Table 2). This was not the case for the Ln-PCR, because the median posterior estimates for the sensitivity were below 30% regardless which interpretation was used for the IFAT. Large uncertainties associated with those estimates resulted in large 95% PPI, particularly when a conservative interpretation of the IFAT was applied (Table 2). In contrast, high estimates were obtained for the specificity of this technique.

The estimated prevalence was higher in the rabbit population, compared with hares (Table 2) as a

result of the higher number of reactors detected using both techniques (Table 1). The model converged properly as indicated by the visual inspection of the chains and the Gelman Rubin statistic <1.1 for all estimated parameters (Additional details are available in Table S3).

No major changes in the posterior estimates were observed when a non-informative prior was used regardless the model used (Table S4).

Inclusion of spleen results did not change the sensitivity of the Ln-PCR, yielding values of 29.6% (95% probability interval: 19.7–68.1) and 21.8% (95% probability interval: 15.4–31.3) for the conservative and sensitive interpretation, respectively.

Assumption of conditional independence between the IFAT and the Ln-PCR test results was supported by the results of the model including a conditional dependence term, with a 95% PPI that encompassed 0.

Discussion

Due to the lack of an acceptable gold-standard (Marfurt *et al.* 2003), a Bayesian analysis was performed here to estimate the field diagnostic sensitivity and specificity of two diagnostic techniques commonly used for detection of infection by *L. infantum* in lagomorphs. This is the first time that this approach

Table 2. Prior (mode and low/up bound for 95% cumulative probability) and posterior estimates (median and 95% Bayesian posterior probability interval) for sensitivity, specificity and prevalence of infection (%) obtained for the combination of diagnostic test and IFAT interpretation criteria on 284 lagomorphs from Madrid (Spain) using a two-population model

	IFAT test estimates		Nested-PCR (skin samples) estimates		Prevalence	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	P rabbits	P hares
Prior estimates	70 (95% cumulative probability>55)	85 (95% cumulative probability>70)	80 (95% cumulative probability>60)	95 (95% cumulative probability>90)	40 (95% cumulative probability>80)	
Beta distributions						
A	22.5135	23.9027	14.8442	99.6983	2.0591	
B	10.2201	5.0417	4.4611	6.1946	2.5886	
Posterior estimates						
Diagnostic interpretation						
IFAT conservative int.	73 (61.3–83.8)	80.2 (62.9–90.8)	28.9 (19.2–70.8)	96.4 (93.3–98.4)	50.5 (13.9–70.1)	6.7 (1.9–22)
IFAT sensitive int.	78.2 (68.2–86.8)	75.9 (61.7–88.8)	21.3 (14.8–31.2)	96.2 (92.7–98.3)	72.6 (51–89.5)	13.2 (1.9–34.7)

is used to evaluate the performance of diagnostic tests in the case of leishmaniasis. Our results demonstrate that the IFAT may be a useful screening tool at the population level, although has a limited specificity. The Ln-PCR using ear skin, on the other hand, lacked sensitivity in the populations of lagomorphs analysed.

Posterior estimates for the sensitivity of the IFAT using the conservative interpretation were in agreement with the prior information, extracted mainly from publications on dogs, humans and, to a lesser extent, cats, whereas the use of a sensitive criterion resulted in an increase of around 5–10%. These results, coupled with evidence suggesting that the titre of antibodies in lagomorphs is generally higher than that observed in humans or dogs (Pastoret *et al.*, 1998), further supports the potential use of this technique as a fast and affordable screening tool. In addition, the ability of the technique to detect both IgM and IgG may allow the detection of infection in early stages. In this study promastigotes obtained after no more than six culture passages were used to obtain the antigen for the IFAT, what could also contribute to an enhanced sensitivity as previously demonstrated in lagomorphs (Moreno *et al.*, 2014).

Specificity of the IFAT was also in the range of the prior information used in the model, although values were lower when a sensitive interpretation was used (Table 2). This result may be explained, at least in part, by the occurrence of false positive reactions caused by cross-reactivity to Trypanosome spp (Moreno *et al.*, 2014), whose presence has been demonstrated, at least, in southern Spain (Díaz-Saez *et al.*, 2014).

In contrast, performance of the Ln-PCR was particularly limited in terms of sensitivity, with median posterior estimates between 20 and 30%, what could be related with a low parasitic load or a limited analytic sensitivity of the PCR. A relatively high parasite load in the skin would be expected in the early stages of infection, as demonstrated in experimental infections in mice (Belkaid *et al.*, 2000; Kamhawi *et al.*, 2000; Nicolas *et al.*, 2000) and asymptomatic dogs (Otranto *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2001), in which *Leishmania* DNA concentration was higher after a recent inoculation of the promastigotes by the phlebotomus. However, rabbits and hares analysed in this

study were captured at the end of the transmission season and therefore could have been exposed early in the year (or in previous seasons). This result is compatible with a large proportion of seropositive animals, as found in both populations, given the duration of the immunity. The lack of detection of macroscopical changes typical of clinical disease in the analysis post-mortem also suggests that infection may have not been severe. In addition, the occurrence of a 'parasite silencing stage' in which the parasite load drops to undetectable levels for a variable period of time until the number of organisms increases again, leading to Ln-PCR false negative results, as already described in natural and experimental *L. infantum* infection in dogs (Oliva *et al.*, 2006; Paranhos-Silva *et al.*, 2003), cannot be ruled out.

Another potential explanation for the limited sensitivity of the Ln-PCR would be a lack of analytic sensitivity, i.e. the inability to detect parasitic DNA in the sample. Still, previous studies have reported a high analytic sensitivity of this PCR, being able to detect DNA from as low as 0.01 promastigote from a *Leishmania* culture (Cruz *et al.*, 2002).

The lack of agreement between IFAT and Ln-PCR observed in our study is likely the result of the different subpopulations targeted by each technique, with IFAT detecting both present but especially past infections regardless parasitic load (Berrahal *et al.*, 1996; Mary *et al.*, 1999) and Ln-PCR being most sensitive in the case of acute infections (Díaz-Saez *et al.*, 2014). This result is consistent with the assumption of independence between tests results initially assumed here, which was confirmed in the sensitivity analysis conducted to test such assumption.

Relatively informative priors were used in the analysis based on previous knowledge. The effect of this selection was explored through the sensitivity analysis, in which results of the two-population model were considered reliable due to the high stability of estimates when their priors were replaced by non-informative distributions.

The significantly higher prevalence estimated in rabbits compared with hares may be due to a different susceptibility to infection. However, the competency of both species to act as reservoirs for *Leishmania* has been demonstrated (Jimenez *et al.*

2014; Molina *et al.* 2012), and therefore differences may be also due to a different infectious pressure on each population. This hypothesis is consistent with the observation that both areas of study are separated by more than 25 km, and highlights the variability that may be found under field conditions in terms of prevalence due to other environmental factors not related with the host species (such as vector density). In addition, frequent aggregation of rabbits in warrens could also favour disease transmission if the vector was present, as this species is known to be a highly attractive blood source for *P. perniciosus* (Benito-De Martín *et al.* 1994; Jiménez *et al.* 2014; Martín-Martín *et al.* 2014), what could also explain at least partly differences with the results in hares.

In conclusion, results here provide quantitative estimates of the accuracy of diagnostic tests for detection of leishmaniasis in lagomorphs. These results will help to design effective strategies for prevention of disease introduction into susceptible animal and human populations in endemically infected areas.

Acknowledgements

The authors thank Pilar Pozo Piñol and Gabriela Luz Torre for their help in the processing of samples.

Source of funding

This work is a contribution to the EU FP7 ANTI-GONE Project (278976) and was partially supported by structural funds of the European Union, S2013/ABI-2747 (TAVS), and by the program 1+D "Vigilancia Sanitaria" from the local government of Madrid.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Contributions

MLdC, and AP performed the statistical analyses and drafted the manuscript. NG designed the sample

collection and supervised the laboratory testing. MD, IM1, IM2 and AN collected the samples and performed laboratory analyses. LD and JA designed the study, coordinated the work and participated in the data analysis and interpretation.

References

- Aransay A.M., Ready P.D. & Morillas-Marquez F. (2003) Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity* **90**, 316–325.
- Arce A., Estirado A., Ordobas M., Sevilla S., García N., Moratilla L. *et al.* (2013) Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* **18**, 20546.
- Ballesteros F. (1998) *Las especies de caza en España. Biología, ecología y conservación*. Estudio y Gestión del Medio. Colección Técnica. Orsted, Spain.
- Banús A.L., Hide M. & Prugnolle F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* **64**, 1–109.
- Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milton G. & Sacks D. (2000) A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology* **165**, 969–977.
- Benito-De Martín M.J., Gracia-Salinas M.J., Molina-Morero R., Ferrer-Dufol M., Lucientes-Curdi J. (1994) Influence of the nature of the ingested blood on the gonotrophic parameters of *Phlebotomus perniciosus* under laboratory conditions. *Parasite (Paris, France)* **1**, 409–411.
- Berrahal F., Mary C., Raze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D. & Dunan S. (1996) Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 273–277.
- Boelaert M., Criel B., Leeuwenburg J., Van Damme W., Le Ray D. & Van der Stuyt P. (2000) Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**, 465–471.
- Branscum A.J., Gardner I.A. & Johnson W.O. (2005) Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine* **68**, 145–163.
- Chitimia L., Muñoz-García C.I., Sanchez-Veloso D., Lizana V., Del Rio L., Murcia L. *et al.* (2011) Cryptic

- Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Veterinary parasitology* **181**, 12–16.
- Cowan D.P. (1984) The use of ferrets (*Mustela furo*) in the study and management of the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Zoology* **24**, 570–574.
- Criado-Fornelo A., Gutiérrez-García L., Rodríguez-Caabeiro F., Reus-García E., Roldán-Soriano M.A. & Díaz-Sánchez M.A. (2000) A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary parasitology* **92**, 245–251.
- Cruz I., Canavate C., Rubio J.M., Morales M.A., Chicharro C., Laguna F. *et al.* (2002) A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96** (Suppl 1), S185–S189.
- Díaz-Saez V., Merino-Espínosa G., Morales-Yuste M., Corpas-Lopez V., Pratlong F., Morillas-Marquez F. & Martín-Sánchez J. (2014) High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Veterinary parasitology* **202**, 119–127.
- Franco F.A., Morillas-Marquez F., Baron S.D., Morales-Yuste M., Galvez R., Díaz V. *et al.* (2010) Genetic structure of *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *International journal for parasitology* **40**, 1335–1346.
- Gallego M. (2004) Emerging parasitic zoonoses: leishmaniasis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **23**, 661–676.
- Galvez R., Miro G., Descalzo M.A., Nieto J., Dado D., Martín O. *et al.* (2010) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary parasitology* **169**, 327–334.
- Galvez R., Descalzo M.A., Guerrero I., Miro G. & Molina R. (2011) Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniasis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 799–806.
- García N., Moreno I., Alvarez J., de la Cruz M.L., Navarro A., Perez-Sancho M. *et al.* (2014) Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *BioMed Research International* **2014**, 318254.
- Gardner I.A., Stryhn H., Lind P. & Collins M.T. (2000) Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine* **45**, 107–122.
- Gelman A. & Rubin D.B. (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical science* **7**, 457–472.
- Gomez-Barroso D., Herrador Z., San Martín J.V., Gherasim A., Aguado M., Romero-Maté A. *et al.* (2015) Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Eurosurveillance* **20**, 1–6.
- Gramiccia M. & Gradoni L. (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International journal for parasitology* **35**, 1169–1180.
- Hitakarun A., Tan-Ariya P., Siripattanapong S., Mungthin M., Piyaraj P., Naaglor T. *et al.* (2014) Comparison of PCR methods for detection of *Leishmania siamensis* infection. *Parasites & Vectors* **7**, 458.
- Jimenez M., Gonzalez E., Irso A., Marco E., Alegret A., Fuster F. & Molina R. (2013) Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology research* **112**, 2453–2459.
- Jimenez M., Gonzalez E., Martín-Martín I., Hernandez S. & Molina R. (2014) Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary parasitology* **202**, 296–300.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E. & Sacks D. (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**, 1351–1354.
- Lachaud L., Chabbert E., Dubessay P., Dereure J., Lamothe J., Dedet J.P. & Bastien P. (2002) Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* **125**, 197–207.
- Lunn D., Thomas A. & Spiegelhalter D. (2000) WinBUGS – a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing* **10**, 325–337.
- Martur J., Nasereddin A., Niederwieser I., Jaffe C.L., Beck H.P. & Felger I. (2003) Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology* **41**, 3147–3153.
- Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N. & Gradoni L. (2013) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology* **27**, 123–147.
- Martin-Martín I., Molina R., Rohousova I., Drahota J., Volf P. & Jimenez M. (2014) High levels of anti-

- Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Veterinary parasitology* **202**, 207–216.
- Martin-Sanchez J., Acedo C., Munoz-Perez M., Pesson B., Marchal O. & Morillas-Marquez F. (2007) Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary parasitology* **145**, 267–273.
- Mary C., Auriant V., Faugere B. & Dessein A.J. (1999) Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infection and immunity* **67**, 5559–5566.
- Millan J., Zanet S., Gomis M., Trisciuglio A., Negre N. & Ferroglio E. (2011) An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transboundary Emerging Diseases* **58**, 352–357.
- Molina R., Jimenez M.I., Cruz I., Iriso A., Martin-Martin I., Sevillano O. et al. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology* **190**, 268–271.
- Moreno I., Alvarez J., Garcia N., de la Fuente S., Martinez I., Marino E. et al. (2014) Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Veterinary parasitology* **199**, 264–267.
- Nicolas L., Sidjanski S., Colle J.H. & Milon G. (2000) *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infection and immunity* **68**, 6561–6566.
- Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T. & Gradoni L. (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of clinical microbiology* **44**, 1318–1322.
- Otranto D., Paradies P., de Caprariis D., Stanneck D., Testini G., Grimm F. et al. (2009) Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* **16**, 337–343.
- Paradies P., Sasanelli M., deCaprariis D., Testini G., Traversa D., Lia R.P. et al. (2010) Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal (London, England, 1997)* **186**, 370–373.
- Paranhos-Silva M., Oliveira G.C., Reis E.A., de Menezes R.M., Fernandes O., Sherlock I. et al. (2003) A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary parasitology* **114**, 97–111.
- Pastoret P., Gabriel P., Bazin H. & Govaerts A. (1998) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Ready P.D. (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = *European Communicable Disease Bulletin* **15**, 19505.
- Sobrinho R., Ferroglio E., Oleaga A., Romano A., Millan J., Revilla M. et al. (2008) Characterization of wide-spread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary parasitology* **155**, 198–203.
- Solano-Gallego L., Riera C., Roura X., Iniesta L., Gallego M., Valladares J.E. et al. (2001) *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary parasitology* **96**, 265–276.
- Solano-Gallego L., Fernandez-Bellon H., Serra R., Gallego M., Ramis A., Fondevila D. & Ferrer L. (2003) Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine veterinary journal* **35**, 320–323.
- Thrusfield M. (2005) *Veterinary Epidemiology, 3rd edition, chapter 13*. Blackwell Sciences, Surveys Oxford, UK.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. IFAT and skin Ln-PCR Sensitivity and specificity reported values in the literature.

Table S2. Distribution of antibody titres of 215 rabbits and 69 hares included in the study.

Table S3. MC errors and Gelman Rubin statistic of posterior estimates obtained for the combination of diagnostic test and IFAT interpretation criteria in a two-population model.

Table S4. Posterior estimates (median and 95% Bayesian posterior probability interval) for sensitivity, specificity and prevalence of infection (%) obtained for the combination of diagnostic test and IFAT interpretation criteria on 284 lagomorphs from Madrid (Spain) when non-informative priors were used in the two-population model.

6.1.2. Evaluación de la fiabilidad del kit IDvet para la prueba del γ -IFN en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en España

La tuberculosis bovina (bTB), causada por miembros de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC; principalmente *M. bovis* y, en menor medida, *M. caprae*) es una enfermedad de graves consecuencias en la salud humana y animal. Debido a que la infección por MTC en el ganado vacuno es generalmente crónica y puede permanecer subclínica durante largos periodos de tiempo, las estrategias de control se basan en la detección temprana y la retirada de los animales infectados del rebaño mediante la aplicación de pruebas diagnósticas ante-mortem, además de la vigilancia rutinaria en matadero. Por ello, la determinación de la precisión de estas pruebas diagnósticas es tan importante.

En España, el programa nacional de erradicación de la bTB en ganado vacuno se basa actualmente en la intradermotuberculinización (IDTB) rutinaria de animales mayores de semanas y el uso en paralelo de la prueba del gamma-interferón (γ -IFN) en explotaciones infectadas. Como prueba complementaria a la IDTB, se ha observado que el γ -IFN aumenta la sensibilidad del sistema diagnóstico, en parte porque es capaz de identificar animales en fases más tempranas de la infección que la IDTB. Existen diferentes versiones de la prueba del γ -IFN; en España se lleva empleando el kit comercial Bovigam desde hace más de 10 años pero, recientemente, se autorizó el uso del nuevo kit comercial IDvet bajo el marco del programa de erradicación. Debido a la falta de evidencia científica sobre la fiabilidad de este último en diferentes contextos epidemiológicos, se llevó a cabo el trabajo aquí presente compuesto por dos estudios diferentes, con el fin de evaluar la capacidad diagnóstica del γ -IFN IDvet en un escenario como el de nuestro país.

En el estudio 1, se analizó la concordancia entre los resultados del nuevo kit IDvet y del Bovigam mediante el estadístico Kappa y se evaluó la capacidad diagnóstica del kit IDvet en relación con el Bovigam mediante un análisis ROC; para ello se recogió información de campo de explotaciones en las comunidades autónomas de Madrid y Castilla y León seleccionadas en base a una prevalencia esperada alta de animales positivos al γ -IFN. Por otro lado, en el estudio 2, los

resultados del Y-IFN IDvet aplicado en paralelo a la IDTB se emplearon para evaluar la concordancia entre ambas pruebas mediante el estadístico Kappa, además de estimarse la sensibilidad y la especificidad de la IDTB y del IDvet mediante un modelo Bayesiano; con este fin, se recogió información de campo de explotaciones seleccionadas al azar de entre aquellas confirmadas como infectadas en las regiones mencionadas anteriormente y donde la prueba del Y-IFN se había implantado de acuerdo al programa de erradicación. Para la proyección del modelo Bayesiano se consideró que las muestras pertenecían a dos poblaciones diferentes (Madrid y Castilla y León) y se asumió una dependencia condicional de los resultados de la IDTB y del Y-IFN IDvet ya que ambas pruebas están basadas en la detección de una respuesta inmune celular. Para la construcción de los *priors* de la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas se consultó la bibliografía científica existente.

La concordancia observada entre los resultados de ambos kits de Y-IFN fue pobre (Kappa= 0,20) y el análisis ROC indicó que, empleando el punto de corte recomendado por el fabricante (35) para el IDvet, éste mostraba una sensibilidad baja (15,1%) relativa al Bovigam en una población altamente infectada. Por otro lado, la sensibilidad del Y-IFN IDvet (35) estimada en el estudio 2 mediante un modelo Bayesiano en una muestra representativa de la población donde esta prueba se emplea de forma rutinaria fue del 36,7% (intervalo de probabilidad posterior del 95%: 14,7-78,8%) y la especificidad estimada cercana al 100%. Sin embargo, cuando se emplearon los puntos de corte alternativos 16 y 4 del IDvet, la sensibilidad estimada ascendió al 49% (24,8-94,1) y 56,0% (30,8-96,3%), respectivamente, manteniendo una alta especificidad. Mientras, la fiabilidad estimada de la IDTB estuvo en consonancia con sus *priors* y la concordancia entre los resultados de esta prueba y del IDvet fue baja (Kappa= 0,34).

Estos resultados sugieren que el kit IDvet para la prueba del Y-IFN, empleando el punto corte 35 recomendado por el fabricante, puede presentar una sensibilidad menor que el Bovigam (cuya fiabilidad fue estimada con anterioridad en un escenario similar) para el diagnóstico de la bTB en explotaciones infectadas en España, y que podría considerarse un ajuste de su punto de corte.



Evaluation of the Performance of the IDvet IFN-Gamma Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Spain

Maria Luisa de la Cruz¹, Adam J. Branscum², Jesus Nacar³, Enrique Pages⁴, Pilar Pozo^{1,5}, Andres Perez⁶, Anna Grau⁷, Jose Luis Saez¹, Lucia de Juan^{1,8}, Rosa Diaz¹, Olga Minguez² and Julio Alvarez^{1,8,9*}

¹VISA-VET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, ²BioStatistics Program, Oregon State University, Corvallis, OR, United States, ³Dirección General de Producción Agropecuaria e Infraestructuras Agrarias, Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain, ⁴Área de Ganadería, Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain, ⁵MAEVA SERVET, S.L., Madrid, Spain, ⁶Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Saint Paul, MN, United States, ⁷Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain, ⁸Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Selma Curt,
Universität Bern, Switzerland

Reviewed by:

Andrew William Byrne,
Agri Food and Biosciences Institute,
United Kingdom
Pierre Joffe,
Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le
Développement (CIRAD), France

*Correspondence:

Julio Alvarez
jalvarez@vets.ucm.es

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Epidemiology and
Economics,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 05 February 2015

Accepted: 04 September 2015

Published: 27 September 2015

Citation:

de la Cruz ML, Branscum AJ, Nacar J,
Pages E, Pozo P, Perez A, Grau A,
Saez JL, de Juan L, Diaz R,
Minguez O and Alvarez J (2015)
Evaluation of the Performance of the
IDvet IFN-Gamma Test for Diagnosis
of Bovine Tuberculosis in Spain.
Front. Vet. Sci. 5:229.
doi: 10.3389/fvets.2015.00229

In Spain, the national bovine tuberculosis (bTB) eradication program is based on yearly skin testing of every ≥ 6 weeks old animal using the single or comparative tuberculin test and parallel use of the interferon-gamma (IFN- γ) assay as an ancillary diagnostic test in infected herds. There are several versions of the latter. Recently, a new commercial IDvet IFN- γ assay has been authorized for use in the program, but there is limited scientific evidence about its performance in different epidemiological settings. Therefore, two studies to evaluate the performance of the IDvet assay were conducted. In study 1, a concordance analysis between the new IDvet and the Bovigam IFN- γ assay in use in Spain for over 10 years was conducted. In study 2, results from the IDvet assay when applied in tandem with a single intradermal tuberculin (SIT) test were used to evaluate the concordance between both tests and to estimate their sensitivity (Se) and specificity (Sp) using a Bayesian latent-class model. Field data from cattle herds located in Madrid and Castilla y León (Spain) were collected. For study 1, herd selection was based on a high expected prevalence of reactors to the IFN- γ assay, while herds were selected at random to estimate Se and Sp of the new IDvet assay in study 2. Agreement between the results obtained with both kits for IFN- γ assay was poor ($\kappa = 0.20$), and a receiver operating characteristic (ROC) analysis indicated a low Se of the new IDvet relative to the Bovigam in a heavily bTB infected population. The Bayesian latent-class analysis estimated the Se of the IDvet assay to be 36.7% [95% probability posterior interval (PPI): 14.7–78.8%] with estimated Sp close to 100% when the cut-off recommended by the manufacturer (35) was applied. At the alternative cut-off values of 16 and 4, the estimated Se of the IDvet assay increased to 49.0% (PPI: 24.8–94.1%) and 56.0% (PPI: 30.8–96.3%), respectively, while maintaining a high specificity. The results suggest that the new IDvet assay may have lower sensitivity than the Bovigam for diagnosis of bTB in cattle herds in Spain, and that adjusting its cut-off might be considered.

Keywords: bovine tuberculosis, cattle, diagnosis, interferon-gamma, bayesian modeling

INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (bTB), caused by members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (mainly *M. bovis*, and to a lesser extent, *M. caprae*) is an important zoonotic disease with a global distribution that has major implications for both animal and human health (1). Implementation of control and eradication programs has led to a significant decrease of the bTB prevalence and to disease eradication in many industrialized countries (1–3). However, eradication efforts have not been uniformly successful, in part because currently available diagnostic tests cannot correctly determine the *M. bovis* infection status of all tested cattle (4). *M. bovis* infection in cattle is usually chronic, can remain subclinical for a long period, and infected cattle can become infectious long before they exhibit clinical signs of bTB (4). When present, the clinical signs of bTB are not pathognomonic. As a result, control strategies have been based on early detection and removal of infected animals from a herd by applying ante-mortem diagnostic tests and routine post-mortem surveillance in abattoir. Hence, determining the accuracy of diagnostic tests for bTB is of paramount importance (5).

Diagnostic tests used for detection of bTB in cattle are mainly based on detecting the cellular mediated immune (CMI) response, which is triggered in the early stages of infection (6). A popular diagnostic technique for this purpose, the single intradermal tuberculin (SIT) test, is based on the inoculation of the bovine purified protein derivative (PPD) in the skin of the neck or in the caudal fold (7). In certain settings the response to the avian PPD inoculated in the other side of the neck is also measured and compared with the bovine response in what is known as the single intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test, used as the routine screening test in countries as the UK and Ireland. In the last 25 years, an additional diagnostic tool for measuring the CMI response, the interferon gamma (IFN- γ) release assay, has been increasingly used (8). This test is based on the detection of IFN- γ produced by lymphocytes present in blood samples stimulated with specific antigens (typically bovine and avian PPD); blood samples are then centrifuged after the stimulation and the resulting plasma is analyzed using a sandwich ELISA (8). As an ancillary test to skin test, the IFN- γ assay has led to increased sensitivity when used in infected herds (9), in part because it can identify animals in an earlier infection stage than the SIT test (10). Therefore, in the European Union its ancillary use is recommended in infected herds located in areas with endemic bTB (annex B of Council Directive 64/432/EEC), such as certain areas of Spain (11).

The first commercially available IFN- γ test (Bovigam, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (12) has been used in multiple European countries, including Spain, and its performance has been extensively evaluated under field conditions (4, 9, 13–19). Recently, another version of the IFN- γ assay has become commercially available (ID Screen[®] Ruminant IFN- γ , IDvet, Grabels, France), but due to its recent development there is limited information available about its performance in different epidemiological settings.

The assessment of test accuracy (i.e., sensitivity, Se, and specificity, Sp) is challenging when infection status cannot be

determined because, for instance, a perfect reference test does not exist or is too invasive for widespread use, as is the case for bTB, in which the usual reference test, isolation of the causative agent, is costly, slow and has a very limited sensitivity in a large proportion of the infected animals (4). Latent class analysis is a modern approach to estimating the accuracy of diagnostic tests in the absence of a perfect reference test (20, 21). In Bayesian latent class analysis, parameters (e.g., sensitivities, specificities, and prevalences) can be estimated by combining prior knowledge with information from the current data. Bayesian latent class models have been used to estimate the diagnostic performance of bTB tests (5, 22–27), often revealing important disagreements between the prior knowledge and the study data.

In Spain, a national bTB eradication program is in place since the 80's, and since 2006 contemplated the addition of the IFN- γ test as an ancillary test to increase diagnostic sensitivity according to the European and Spanish regulations. During this period the bTB herd prevalence has decreased from >10 to 2.67% in 2016, but the progress in the last decade has been more limited (11). Here, we conducted a study to evaluate the performance of the new commercial IFN- γ test (called thereafter IDvet test) that has been recently authorized for use as part of the Spanish bTB eradication program. Field data were collected to accomplish two goals, namely to conduct a concordance analysis between the new IDvet test and the Bovigam IFN- γ assay (called thereafter Bovigam test), which has been used in Spain for over 10 years (study 1) and to assess the concordance between the IDvet and SIT tests and estimate their Se and Sp in the absence of a gold standard (study 2).

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Study 1. Evaluate the IDvet Test Using the Bovigam Test as a Reference

The new IFN- γ assay (ID Screen[®] Ruminant IFN-g, IDvet, Grabels, France) and the pre-existing IFN- γ test (Bovigam[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were compared using results from 1,181 cattle from 18 herds located in the regions of Madrid [884 cattle (74.9%) from 11 herds] and Castilla y Leon [297 cattle (25.1%) from 7 herds], in central and west-central Spain, respectively. These herds were selected from among those being tested using the IFN- γ assay during the bTB eradication program in 2015 and 2016 based on a high expected prevalence of reactors to the IFN- γ assay. A detailed explanation on the epidemiological situations in which the test is implemented in Spain is available elsewhere (28). The majority of the sample (84.1% of the animals and 88.9% of the herds) was represented by beef herds (993 animals and 16 herds), followed by bullfighting (103 animals and one herd) and dairy herds (85 animals and one herd).

Study 2. Estimate the Se and Sp of the IDvet Test in the Field

Test results were obtained from 8,426 cattle (78 herds) subjected to the SIT test and IDvet test during 2016. Herds were again located in the Madrid [22 herds, 1,550 animals (18.4%)] and Castilla y Leon [56 herds, 6,876 animals (81.6%)] regions, and

they were randomly selected among the bTB confirmed infected herds in the two regions in 2016 in which the IFN- γ assay had been implemented according to the Spanish eradication program (11). Beef was again the predominant production type (19 herds and 1,204 animals in Madrid; 41 herds and 4,382 animals in Castilla y León), followed by dairy (one herd-44 animals and 10 herds-1676 animals in Madrid and Castilla y León, respectively), bullfighting (two herds-300 animals and two herds-339 animals in Madrid and Castilla y León, respectively), and mixed farms (3 herds and 481 animals, all in Castilla y León).

Diagnostic Tests

Single Cervical Intradermal Tuberculin Test (SIT)

The SIT test was performed according to European and Spanish regulations (RD2611/1996, transposition of annex A of Council Directive 64/432/EEC) by field practitioners in all >6 week-old animals at the herd by intradermal inoculation of 0.1 ml of the official bovine PPD (CZ Veterinaria, Porriño, Spain) in the anterior neck area (29). After 72 h, animals with a >2 mm increase of the skin fold thickness (or with presence of clinical signs at the inoculation site) were considered reactors (severe interpretation) following the Spanish National Bovine Tuberculosis Eradication Program (11) and culled within 15 days.

IFN- γ Assay

Heparinized blood samples were collected from every animal prior to intradermal injection of the PPDs, and delivered to the laboratory in Madrid or Castilla y León within 8 h of collection at room temperature, according to the Spanish National Bovine Tuberculosis Eradication Program (11). Stimulation with bovine and avian PPDs (CZ Veterinaria) at a final concentration of 20 μ g/ml, and nil antigen phosphate buffer saline (PBS) was carried out as described elsewhere (8). Plasma samples were harvested after centrifugation and stored at -20°C until testing for detection of the IFN- γ with one or both sandwich ELISA evaluated here.

Bovigam[®] IFN- γ

The Bovigam test was carried out following procedures described elsewhere (12). An animal was considered positive when the optical density (OD) of the aliquot stimulated with bovine PPD minus the OD of the nil (bovine IFN) was ≥ 0.05 and greater than the OD of the sample stimulated with avian PPD minus the nil (avian IFN), and negative in any other case (11).

ID Screen[®] Ruminant IFN- γ , IDvet

The IDvet test was performed according to the manufacturer instructions (IFNG ver 0617 ES). Briefly, samples were divided into three aliquots and incubated with PBS (blank), bovine (activated sample) or avian (control sample) PPD. When OD values >2.5 were obtained in the blank or both the control and activated sample (suggestive of unspecific reactions) samples were diluted 1:5 in order to bring OD levels into the linear region of OD measurement and reanalyzed as indicated by the

manufacturer. Results were then transformed into sample-to-positive ratios (S/P):

$$\frac{S}{P} = \left(\frac{OD \text{ activated sample} - OD \text{ control sample}}{OD \text{ mean kit positive control} - OD \text{ meankit negative control}} \right) * 100$$

Samples were considered positive when the S/P ratio was ≥ 35 according to the manufacturer instructions. In addition, alternative cut-off points were evaluated, as described below.

Statistical Analysis

Concordance Analysis

Agreement between the qualitative results obtained from both IFN- γ kits (study 1) and between the IDvet test and the SIT test (study 2) was measured using the kappa statistic. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate the performance of the IDvet test at different cut-offs in relation to the Bovigam (study 1), with Youden's index used to assess optimal cut-off values. The same tests were performed using only the data from beef cattle. These analyses were carried out using SPSS V. 20 (IBM Inc., Chicago, IL, USA) and the "pROC" (30) and "ROCR" (31) packages from R 3.4 (32).

Latent Class Analysis

We followed the guidelines for reporting of diagnostic accuracy in studies that use Bayesian latent class models (STARD-BLCM) (21).

A Bayesian latent-class model was used to estimate the Se and Sp of the SIT test and the IDvet test in infected herds (study 2), in the absence of a gold standard (33, 34). Samples were considered to belong to two different populations based on the region of origin (Madrid and Castilla y León) of herds and the two tests were assumed to be conditionally dependent (33) since both are based on the detection of the cell-mediated immune response (10).

Prior beta distributions for the Se and Sp of the SIT and IDvet tests were built according to reported/estimated values (5, 7, 35–38) (Table 1) based on the most likely value and a low 95% credibility interval using ParameterSolver V3.0 (University of Texas MD Anderson Cancer Center). For the IDvet test, larger prior standard deviations were used to reflect the uncertainty in its Se and Sp due to the lack of prior information for this kit and the findings from study 1 (see Results). Covariances between the SIT test and IDvet test for infected and non-infected subpopulations were specified as previously described (39), and these parameters were modeled with uniform prior distributions related to the Se and Sp of the tests (40) (Supplementary File 1).

Based on data collected in 2014–2015 from infected herds in Castilla y León and Madrid, the common prior distribution for the bTB prevalence was assigned a mode of 5% and a 95th percentile of 20% [specifically, beta(0.99, 13.4)] for both regions.

A sensitivity analysis to evaluate the impact of the priors on the results of the model was conducted using diffuse uniform (0, 1) distributions alternatively for the Se and Sp of each test. Model estimates (posterior medians and 95% posterior

TABLE 1 | Prior estimates of sensitivity and specificity of the SIT test and the IDvet test.

Diagnostic test	Performance measure	Prior estimates		Reference	
		Mode and 5th percentile	Beta distribution	Authors, year	Reported/estimated values
SIT test	Sensitivity (%)	69 (>40)	alpha: 5.65 beta: 2.71	Alvarez et al. (5)	69.4 (40.1–92.2)
				de la Rúa-Domenech et al. (4)	83.9 (83.2–100)
	Specificity (%)	95 (>75)	alpha: 8.65 beta: 0.73	Monaghan et al. (7)	68–95
				Wood et al. (37)	68.1
IDvet test	Sensitivity (%)	90 (>50)	alpha: 3.35 beta: 0.62	Wood et al. (35)	65.6 (56.6–73.9)
				Alvarez et al. (5)	90.4 (86.7–93.9)
	Specificity (%)	90 (>80)	alpha: 33.1 beta: 3.97	de la Rúa-Domenech et al. (4)	90.8 (75.5–99.0)
				Monaghan et al. (7)	96–99
IDvet test	Sensitivity (%)	90 (>50)	alpha: 3.35 beta: 0.62	Wood et al. (37)	96.7
				Alvarez et al. (5)	89.3 (77.5–97.2)
	Specificity (%)	90 (>80)	alpha: 33.1 beta: 3.97	de la Rúa-Domenech et al. (4)	87.6 (73.0–100)
				Gormley et al. (35)	88
IDvet test	Sensitivity (%)	90 (>50)	alpha: 3.35 beta: 0.62	Núñez-García et al. (33)	67 (49–82)
				Wood et al. (37)	81.8
	Specificity (%)	90 (>80)	alpha: 33.1 beta: 3.97	Wood et al. (35)	80.8 (72.8–87.3)
				Alvarez et al. (5)	85.7 (84.4–87.6)
IDvet test	Sensitivity (%)	90 (>50)	alpha: 3.35 beta: 0.62	de la Rúa-Domenech et al. (4)	90.6 (85.0–99.6)
				Gormley et al. (35)	95
	Specificity (%)	90 (>80)	alpha: 33.1 beta: 3.97	Núñez-García et al. (33)	93 (86–99)
				Wood et al. (37)	99.1
IDvet test	Sensitivity (%)	90 (>50)	alpha: 3.35 beta: 0.62	Wood et al. (35)	90

probability intervals, PPI) were compared with those obtained using the informative priors. Models were also run only using the data from beef cattle as an additional sensitivity analysis. In addition, alternative cut-offs for the IDvet test (S/P ratio= 16 and 4) were evaluated.

Three Markov chain Monte Carlo runs were implemented in order to visually assess convergence and mixing of the chains. Convergence was also assessed using the Gelman-Rubin diagnostic (41). Posterior inference was based on 5,000 iterations after discarding the first 2,500 as burn-in. Autocorrelation was eliminated through thinning the chains by collecting one in 10 consecutive samples. All analyses were conducted using OpenBUGS V. 3.2.3 (42) called through R, version 3.4 (32) using the “R2OpenBUGS” package (43). The OpenBUGS code is provided as supplementary material (Supplementary File 1).

RESULTS

Concordance Analysis

The number of reactors to each test in both studies are shown in Table 2. Agreement between the results obtained with the Bovigam and the IDvet tests (study 1) was poor (Kappa = 0.20), with most of the discordant results being positive in the

former and negative in the new test (Table 2). The ROC analysis indicated that at the manufacturer recommended cut-off of 35 for the IDvet, Se relative to the Bovigam test was low (Se = 15.1% and Sp = 99.9%). Better agreement was achieved when lower cut-offs (16 and 4) were used (Kappa = 0.52 and 0.71, with Se = 38.8 and 65.5, respectively, and Sp > 98.5%). A high value of 92.5% (95% CI: 89.6–95.3%) was obtained for the AUC (Figure 1). The optimal cut-off point according to Youden’s index in relation to the Bovigam was 1.3 (yielding Se = 81.3% and Sp = 94.2%). When only beef cattle were considered, very similar Kappa values were obtained regardless of the cut-off used (0.20, 0.52, and 0.70 for cut-offs 35, 16, and 4, respectively), with also a very high AUC (90.9%) and a similar optimal cut-off point (1.7).

Agreement between the IDvet test and the SIT test (study 2) was slightly higher (Kappa = 0.34), although important differences were still observed (Table 2). When the results were analyzed separately by production type, the agreement was higher for beef cattle (Kappa = 0.43) and close to zero for dairy and mixed herds (Kappa = 0.08 and –0.01, respectively), whereas it could not be calculated for bullfighting cattle due to the lack of SIT reactors. For cut-off values of 16 and 4, the agreement between tests decreased to Kappa values of 0.27 and 0.14, respectively (Supplementary Table 1).

TABLE 2 | Number of reactors to the IDvet test and to the Bovigam test performed on 1,181 cattle (study 1), and number of reactors to the IDvet test and to the SIT test (severe interpretation) performed on 8,426 cattle (study 2) from Madrid and Castilla y Leon (Spain).

			IDvet test (99)		Total	
			Negatives	Positives		
Study 1	Bovigam test (0.05)	Negatives	1,087	1	1,181	
		Positives	82	11		
Study 2	Madrid	SIT test (severe int)	Negatives	1,509	8	1,548
			Positives	22	9	
	Castilla y Leon	SIT test (severe int)	Negatives	6,738	76	6,878
			Positives	55	29	

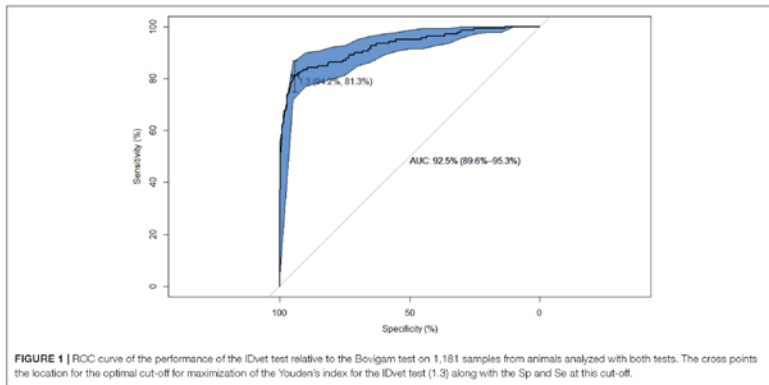


FIGURE 1 | ROC curve of the performance of the IDvet test relative to the Bovigam test on 1,181 samples from animals analyzed with both tests. The cross points the location for the optimal cut-off for maximization of the Youden's index for the IDvet test (1.3) along with the Sp and Se at this cut-off.

Latent Class Analysis

The Bayesian latent class analysis yielded posterior estimates (median and 95% PPI) for the IDvet test of Se = 36.7% (14.7–78.8%), with very high Sp (Table 3). The posterior distribution of Se for the IDvet test was shifted below its prior distribution (Supplementary Figure 1), whereas the opposite was true for its Sp. In contrast, the posterior estimates of the performance of the SIT test were largely in agreement with the prior information.

Conditional dependence between the SIT test and the IDvet test was estimated to be very low in both the infected (correlation coefficient of positive results: -0.002, 95% PPI -0.13 to 0.09) and non-infected (correlation coefficient of negative results: 0.002, 95% PPI 0.00 to 0.004) populations, suggesting a possible conditional independence between the results of each test. Note that, in general, conditional independence occurs when Sp's are close to 100%.

A sensitivity analysis (Supplementary Table 2) resulted in no major changes to the posterior distribution of Se and Sp for both tests (the magnitudes of all percent differences were < 8%),

except when a uniform prior was used for the Se of the IDvet test assay where a percent decrease of 41% was observed for the posterior median (36.7 vs. 21.6). Prevalence estimates were similar across analyses that used different priors (e.g., overlapping 95% PPIs), and were 2–3 times higher in the region of Madrid than in Castilla y Leon. When only values from beef herds were used in the analysis, the 95% PPI for the sensitivity of the IDvet test was similar (19–88%) but a higher median value was found (60.9%), while changes in the posterior estimates for the sensitivity of the SIT test and the specificities of both techniques were small (12% of median estimates). Similar estimates were obtained when using a burn-in of 20,000 posterior iterates and 50,000 total iterates.

At cut-off points of 16 and 4 for the interpretation of the IDvet test, the estimated Se of the IFN-γ assay increased (as expected) to 49.0 and 56.0%, respectively, while maintaining a high specificity (Table 3). The posterior estimates for the performance of the SIT test and the bTB prevalence were not affected by the cut-off applied in the IDvet test (Table 3).

TABLE 3 | Posterior estimates (median and 95% posterior probability interval) for sensitivity, specificity and the mean of the prevalence distribution (%) obtained for the combination of IDvet test and SIT test on 8,426 cattle from Madrid and Castilla y Leon (Spain), for different prior distributions and IDvet alternative cut-off points.

Model	Priors	Diagnostic test	Sensitivity	Specificity	Prevalence	
					Madrid	Castilla y Leon
Original	Original priors (Table 1)	SIT test	78.65 (49.23–95.00)	99.53 (88.95–99.98)	1.85 (0.51–3.34)	0.64 (0.04–1.43)
		IDvet 3.5 ^A	36.69 (14.65–78.81)	98.78 (98.41–99.18)		
Alternative cut-off points for IDvet	Original priors (Table 1)	SIT test	76.69 (47.05–94.51)	99.55 (88.95–99.99)	1.90 (0.59–3.50)	0.69 (0.04–1.56)
		IDvet 1 ^B	49.03 (24.85–94.13)	87.86 (87.38–88.36)		
	Original priors (Table 1)	SIT test	76.41 (45.11–94.41)	99.61 (88.99–99.99)	1.95 (0.70–3.62)	0.78 (0.05–1.71)
		IDvet 2 ^C	55.95 (30.75–96.34)	93.89 (93.25–94.57)		

^ACut-off recommended by the manufacturer.

^BCut-off for interpretation = 16.

^CCut-off for interpretation = 4.

There was no evidence for lack of convergence of the Markov chains used to simulate from the posterior distribution (Supplementary Figure 2), as indicated by graphical assessment of the chains and the Gelman-Rubin statistic <1.001 for all parameters.

DISCUSSION

Multiple factors related with the host, the pathogen and the environment may affect the performance of a diagnostic test, and, therefore, extrapolation of results obtained in different epidemiological settings may lead to biased and misleading conclusions. For this reason, in the studies presented here we aimed at estimating, by using a variety of analytical approaches, the performance of the new commercial IDvet test under field conditions in bTB infected herds of Spain. Even though both Bovigam and IDvet tests share the same target (IFN-γ produced by lymphocytes stimulated with bovine PPD), when the results obtained in both assays were compared (study 1), the agreement was poor (Kappa = 0.20). In addition, the Se of the IDvet test relative to the Bovigam test in a population formed by heavily bTB infected cattle herds was very low (15.1%), although given the limited specificity of the Bovigam (with estimates between 84.4 and 99.6%) (4, 5, 35–38) a proportion of false positive reactions to this test could be expected, and therefore this figure could be an underestimation of its true sensitivity. Nevertheless, the high AUC values obtained when the quantitative readings obtained in the IDvet test were compared with the qualitative response in the Bovigam test (92.5, 90.9% when only beef animals were considered) suggested that there was in fact a close relationship between the response measured in both tests. Moreover, the ROC analysis suggested that decreasing the cut-off in the IDvet test (thus requiring a lower difference between the response recorded in the sample stimulated with bovine

PPD compared with the avian PPD to define an animal as a reactor) could lead to a substantial increase in the agreement between both tests (Figure 1), despite the different calculations used to define the positive status (see Material and Methods). In addition to the comparison of the responses after the *in-vitro* stimulation with avian and bovine PPD to define a reactor considered in both the Bovigam and IDvet tests, the protocol of the IDvet test includes an extra step (dilution of samples) to avoid false positive reactions due to sensitization with other cross-reacting microorganisms such as *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, that are known to affect the performance of IFN-γ based assays in domestic ruminants (44). Although this could have theoretically contributed to the observed differences between both tests, less than 1% of the samples included in study 1 had to be diluted because of high readings in the control and activated samples, and therefore this was not a major source of variation in our study.

A limited agreement between the IDvet test and the SIT test (Kappa= 0.34; study 2) was also observed. This is consistent with a field scenario in which animals are subjected to frequent skin testing and SIT-reactors have been already removed when the IFN-γ assay is introduced for the first time in infected herds (7, 10, 12, 45–47). This limited agreement between the SIT test and the IDvet test, coupled with the low posterior estimates for the codependence terms obtained in the latent class analysis (correlation coefficient range: -0.13 to 0.09 and 0.00 to 0.004, for infected and non-infected animals, respectively) are in agreement with estimates obtained for the Bovigam test (5), and reinforce the potential usefulness of the application of IFN-γ based assays in parallel to the SIT test to maximize the diagnostic sensitivity (45, 48, 49). In the case of the IDvet test, however, results from the Bayesian latent class model (study 2) confirmed the apparent lower Se of the IDvet test compared with the Bovigam test observed in study 1, since posterior estimates of the IDvet Se were

significantly lower than those recently estimated for the Bovigam test using a similar—though wider—prior (36.7, 95% PPI 14.7–78.8, vs. 89.3, 95% PPI 77.5–97.2 estimated previously for the Bovigam test) (5). The very large uncertainty in the IDvet Se posterior estimates may be also influenced by the small number of IDvet reactors in the sample (Table 2). In contrast, the results obtained for the SIT test in this study and the previous one were comparable, with higher median estimates obtained here but very similar PPI (78.7, 95% PPI 49.3–95.0, compared with 69.4, 95% PPI 40.1–92.2) (5). When only data from beef herds were analyzed, a higher posterior median value for Se of the IDvet was obtained (60% compared with 37% when analyzing all animals) although the 95% PPI was similar, and values were nevertheless still lower than previous estimates obtained for the Bovigam test as well as the priors used in the analysis. In fact, the sensitivity analysis revealed a conflict between the prior information used for the Se of the IDvet test in this study and the data, because when a non-informative prior was used the posterior estimates for its Se were even lower compared to the use of the informative prior using all animals (Supplementary Table 2) or only beef cattle (data not shown). This confirms the hypothesis that the IDvet test had a significantly lower Se compared to the early test (Table 3).

Our results contradict those obtained in experimental studies carried out in France, Belgium and Mexico, in which high values of Se (88.3, 95% CI: 81.1–95.5) and Sp (99.0, 95% CI: 98.4–99.6) were reported (50). Those trials however involved a relatively limited number of animals ($n = 77$) already positive to either PCR, culture or the SIT test, thus representing a potentially biased subpopulation of all infected animals present in an infected herd, what could lead to an overestimation of the sensitivity of the test (51).

Similar to the observation of study 1, results from study 2 suggest that a decrease in the cut-off value in the interpretation of the IDvet test could substantially increase the sensitivity of the test (see Table 3 and Figure 1), in agreement with a previous study (47), while maintaining a high specificity (median posterior values >93.9%). Given that in the EU the Bovigam test is applied to maximize the number of infected animals detected, this may be a reasonable approach when samples from infected herds are analyzed. However, further validation of this hypothesis may be required.

Here, a two-population approach was used because infected herds located in the same region were expected to present similar prevalence levels, as reflected in the official bTB reports for the previous years (52). In fact, the ratio between the estimated bTB prevalence in each region (Madrid/Castilla y León; Table 3) and the reported in 2016 is similar, 2.9 and 2.6, respectively, even though posterior estimates were below the most likely prior values.

The use of a latent class analysis allowed overcoming the limitations of the gold-standard approach, since all available reference tests for bovine tuberculosis have low sensitivity particularly in early stages of infection, when its detection is most critical (4, 53). However, for the comparison between the performance of the IDvet and Bovigam tests a latent class model

was not used because the population had been selected based on an expected high prevalence of infection. Hence, the assessed population was not representative of the field situation, so that it only allowed a comparison of the performance of the tests in that very specific context. Still, results obtained in that potentially biased population suggested that the IDvet test could have a lower Se compared with the Bovigam test. For study 2, animals were selected randomly from infected herds in which the SIT test and the IDvet were being implemented routinely, and hence were considered truly representative of the situation in which the performance of the test was intended to be determined.

In conclusion, our results suggest that the IDvet test may have a lower sensitivity than the Bovigam for diagnosis of bTB in cattle herds in Spain when the cut-off recommended by the manufacturer is applied. Decreasing the cut-off may result in a substantial increase of the sensitivity while maintaining a high specificity, although generalization of that result would require verification under alternative epidemiological settings and conditions.

ETHICS STATEMENT

Animals included in this study were only subjected to the regular tests performed in the framework of the Spanish official program for eradication of bovine tuberculosis, and therefore no experimental research on animals was conducted in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MdC, AB, PR, and JA conceived and performed the statistical analyses. MdC, and JA drafted the manuscript. JN, EP, AG, JS, RD, and OM participated in the generation, collection and curation of the data, and collaborated in interpretation of the results. AP, LdJ, and JA designed the study and coordinated the work. All authors revised critically the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was partially supported by the Programa de Tecnologías Avanzadas en Vigilancia Sanitaria (TAVS) from the Comunidad de Madrid (ref. S2013/ABI-2747).

ACKNOWLEDGMENTS

JA is recipient of a Ramón y Cajal postdoctoral contract from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) (RYC-2016-20422). We thank the Mycobacteria Unit of the VISAVET Health Surveillance Center for their technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00229/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Collins JD. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Vet Microbiol.* (2005) 112:369–81. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.044
- Cousins DV, Roberts JL. Australian campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis* (2001) 81:5–15. doi: 10.1054/tube.2000.0261
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* (2016) 14:e04634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
- de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley ES. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* (2006) 81:190–210. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.11.005
- Abarez J, Perez A, Bezos J, Marques S, Grau A, Saez JL, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol.* (2012) 155:38–43. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.034
- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, et al. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* (2001) 81:103–7. doi: 10.1054/tube.2000.0258
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JE, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* (1994) 46:111–24. doi: 10.1016/0378-1135(94)90050-7
- Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci.* (1990) 49:46–9. doi: 10.1016/0378-1135(90)0044-0
- Anonymous Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU. Accepted by the Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force on Monitoring Animal Disease Eradication. SANCO/10209/2006. (2006).
- Pollock JM, Welsh MD, McNair J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol.* (2005) 108:37–43. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.08.012
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2017. (2017).
- Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* (2001) 81:147–55. doi: 10.1054/tube.2000.0272
- Lahuerta-Martín A, Gallagher M, McErdie S, Skuce R, Merzies E, McNair J, et al. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. *Vet Res.* (2015) 46:93. doi: 10.1186/s13567-015-0242-8
- Lahuerta-Martín A, McNair J, Skuce R, McBride S, Allen M, Strain SAL, et al. Risk factors for failure to detect bovine tuberculosis in cattle from infected herds across Northern Ireland (2004–2010). *Res Vet Sci.* (2016) 107:233–9. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.06.014
- Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AC, Coddle PJ, Clifford DL, et al. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun.* (2005) 73:6467–71. doi: 10.1128/IAI.73.10.6467-6471.2005
- Abarez J, Perez A, Marques S, Bezos J, Grau A, de la Cruz ML, et al. Risk factors associated with negative *in vivo* diagnostic results in bovine tuberculosis infected cattle in Spain. *BMC Vet Res.* (2014) 10:14. doi: 10.1186/1746-6148-10-14
- Clegg TA, Good M, Doyle M, Daignan A, More SJ, Gormley E. The performance of the interferon gamma assay when used as a diagnostic or quality assurance test in *Mycobacterium bovis* infected herds. *Prev Vet Med.* (2017) 140:116–21. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.03.007
- Gormley E, Doyle M, Daignan A, Good M, More SJ, Clegg TA. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN γ) assay. *Vet Res.* (2013) 44:117.
- EFSA. Scientific opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA J.* (2012) 10:2975. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2975
- Collins J, Haythorn M. Estimation of diagnostic test accuracy without full verification: a review of latent class methods. *Stat Med.* (2014) 33:4141–59. doi: 10.1002/sim.6218
- Kostoulas E, Nielsen SS, Branscum AJ, Johnson WC, Dendukuri N, Dhand NK, et al. STARD-BLCC: standards for the reporting of diagnostic accuracy studies that use Bayesian latent class models. *Prev Vet Med.* (2017) 138:37–47. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.01.006
- Muller B, Voumatsou E, Nganjolo ES, Diginbayev-Djaïbe C, Schiller I, Mang-Hawle B, et al. Bayesian receiver operating characteristic estimation of multiple tests for diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. *PLoS ONE* (2009) 4:e8215. doi: 10.1371/journal.pone.0008215
- Clegg TA, Daignan A, Whelan C, Gormley E, Good M, Clarke J, et al. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Vet Microbiol.* (2011) 151:68–76. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.027
- Packen VB, Knubben-Schweizer G, Dopfer D, Groll A, Hafner-Marx A, Hormansdorfer S, et al. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: a latent class analysis. *PLoS ONE* (2017) 12:e0179847. doi: 10.1371/journal.pone.0179847
- Berningham ML, Handal TG, Glass ET, Woodlams JA, de Clare-Bronsvort BM, McBride SH, et al. Hui and Walter's latent-class model extended to estimate diagnostic test properties from surveillance data: a latent model for latent data. *Sci Rep.* (2015) 5:11861. doi: 10.1038/srep11861
- O'Flare A, Orton RI, Bessell PR, Kao RR. Estimating epidemiological parameters for bovine tuberculosis in British cattle using a Bayesian partial likelihood approach. *Proc Biol Sci.* (2014) 281:20140248. doi: 10.1098/rspb.2014.0248
- Praad A, Buschiroli ML, Meyer I, Garin-Bastuji B, Dufour B. Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Epidemiol Infect.* (2015) 143:157–66. doi: 10.1017/S0950268814000338
- Abarez J, Perez AM, Bezos J, Casal C, Romero B, Rodríguez-Campos S, et al. Eradication of bovine tuberculosis at a herd level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 year period. *BMC Vet Res.* (2012) 8:100. doi: 10.1186/1746-6148-8-100
- Casal C, Abarez J, Bezos J, Quirk H, Díez-Guerrero A, Romero B, et al. Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev Vet Med.* (2015) 121:86–92. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.07.001
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lissach F, Sanchez JC, et al. pROC: an open source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* (2011) 12:77. doi: 10.1186/1471-2105-12-77
- Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* (2005) 21:3910–1. doi: 10.1093/bioinformatics/bti623
- R Core Team. *R: A Language and Environment For Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2017). Available online at: <https://www.R-project.org/>.
- Gardner IA, Stryhn H, Lind E, Collins MT. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev Vet Med.* (2000) 45:107–22. doi: 10.1016/S0167-5877(00)06119-7
- Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO. Estimation of diagnostic test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med.* (2005) 68:145–63. doi: 10.1016/j.prevetmed.2004.12.005
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol.* (2006) 112:171–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.029
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, et al. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J.* (1991) 68:286–90. doi: 10.1111/j.1751-0813.1991.tb03254.x
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fitts T, McCormick BS, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* (1992) 31:71–9.
- Nunez-Garcia I, Downs SH, Parry JE, Abernethy DA, Broughan JM, Cameron AR, et al. Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and

- Ireland. *Prev Vet Med.* (2017) 153:94–107. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.02.017
39. Dendukuri N, Joseph L. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* (2001) 57:158–67. doi: 10.1111/0006-341X.2001.03158X
40. Brancum AL, Gardner IA, Johnson WO. Bayesian modeling of animal- and herd-level prevalences. *Prev Vet Med.* (2004) 66:101–12. doi: 10.1016/j.prevetmed.2004.09.009
41. Gelman A, Rubin DR. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat Sci.* (1992) 7:457–72.
42. Luin D, Spiegelhalter D, Thomas A, Best N. The BUGS project: evolution, critique and future directions. *Stat Med.* (2009) 28:3049–67. doi: 10.1002/sim.3680
43. Sturtz S, Ligges U, Gelman A. R:OpenBUGS: A Package for Running OpenBUGS from R. (2010) Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/R2OpenBUGS/vignettes/R2OpenBUGS.pdf>
44. Alvarez I, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Marquis S, et al. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol.* (2009) 135:889–93. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.060
45. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec.* (1994) 135:134–5. doi: 10.1136/vr.135.6.134
46. Voedsmeijer M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, de la Rúa R. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet Rec.* (2004) 155:37–8.
47. Caol C, Infantes JA, Risalde MA, Díez-Guerrero A, Domínguez M, Moreto I, et al. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Res Vet Sci.* (2017) 112:214–21. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.012
48. Alvarez I, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Reviriego Gordejo FI, et al. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet Microbiol.* (2008) 128:72–80. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.034
49. Aranzaz A, De Juan L, Begoa J, Alvarez I, Romero B, Lozano E, et al. Assessment of diagnostic tools for identification of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res.* (2006) 37:593–606. doi: 10.1016/j.vetres.2006.02.011
50. Validation report 1. A Complete Solution for the Diagnosis of *Bovine tuberculosis*. IDvet PPD Tuberculin Antigens and the ID Screen® Ruminant IFN-g ELISA. 1–24.
51. Lijnen JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bonsel GJ, Prins MH, van der Meulen JH, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *J Am Med Assoc.* (1999) 282:1061–6. doi: 10.1001/jama.282.11.1061
52. MAPAMA. Informe Final Técnico. Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina, Año 2016. SANTE/2016/ES/SI2725889 (2017).
53. Adams LG. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev Sci Tech.* (2001) 20:304–24. doi: 10.23546/rst.20.1.1267

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 de la Cruz, Brancum, Nacar, Pego, Peco, Perez, Grana, Sanz, de Juan, Díez, Minguet and Alvarez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6.2. Capítulo II

6.2.1. Dinámica espacial de la tuberculosis bovina en la Comunidad Autónoma de Madrid, España (2010-2012)

En España existe un programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina (bTB) desde el año 1987, lo que ha resultado en un marcado descenso de la prevalencia de bTB a nivel de rebaño (desde un 11,4% en 1986 a un 1,31% en 2012). A pesar del éxito del programa, la enfermedad continúa estando presente en niveles preocupantes en algunas áreas del país, entre ellas la Comunidad Autónoma de Madrid, lo que apunta a la presencia en estas áreas de factores que impiden el progreso de la campaña. El empleo del análisis espacial puede ayudar a identificar *clusters* de persistencia de la enfermedad y, contribuir de esta forma, a la identificación de estos factores, permitiendo la implantación de medidas de control focalizadas. Además, la combinación del análisis espacial con la caracterización molecular proporciona conocimiento en lo que a la transmisión de la enfermedad se refiere.

Por todo lo anterior, se analizó la información recogida a través del mismo programa de erradicación en la Comunidad de Madrid en un periodo de tres años (2010-2012) con el fin de identificar *clusters* de explotaciones positivas a bTB y de explotaciones infectadas con determinadas cepas de *Mycobacterium bovis* (caracterizadas mediante las técnicas de espigotipado y MIRU-VNTR). Además, se estimó el coeficiente de transmisión intra-rebaño (β) de las explotaciones infectadas, entendiéndose éste como el promedio de nuevos animales infectados a raíz de un animal infeccioso por unidad de tiempo, y se evaluó su distribución espacial, así como su posible asociación con determinados factores de rebaño y brote.

El análisis de la posible agrupación espacial de explotaciones positivas/perfiles moleculares prevalentes se llevó a cabo mediante el modelo de Bernoulli del *spatial scan statistic*. Por otro lado, la posible autocorrelación espacial

incremental (ISA) de los coeficientes β transformados logarítmicamente fue evaluada mediante el estadístico I de Moran utilizando una serie de bandas de distancia en aumento hasta un máximo de 22 km. En caso de que se identificara una autocorrelación significativa, se identificó la localización de los clusters mediante el estadístico Getis-Ord G^*i . La posible asociación de factores de rebaño/brote con los coeficientes β transformados logarítmicamente se llevó a cabo empleando un modelo de regresión múltiple.

Se identificó una agrupación significativa de explotaciones positivas mantenida a lo largo de los tres años de estudio en una localización determinada dentro de la Comunidad de Madrid, la cual se denominó "área de alto riesgo". Se observó que el 70% de las cepas espigotipadas correspondían únicamente a tres perfiles (SB0339, SB0121 y SB1142). La tipificación adicional de estos perfiles procedentes del área de alto riesgo con la técnica MIRU-VNTR reveló la posible endemidad de un número reducido de patrones SB0339-VNTR y SB1142-VNTR ampliamente distribuidos en la región, sugiriendo una transmisión mantenida en esta área. La autocorrelación espacial hallada en la distribución de los coeficientes de transmisión estimados en distancias inferiores a los 14 km apoya la hipótesis de la presencia de factores locales que determinan la transmisión de la enfermedad entre explotaciones vecinas.

RESEARCH ARTICLE

Spatial Dynamics of Bovine Tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010–2012)

Maria Luisa de la Cruz¹, Andres Perez², Javier Bezos^{1,3}, Enrique Pages⁴, Carmen Casal¹, Jesus Carpintero⁴, Beatriz Romero¹, Lucas Dominguez^{4,5}, Christopher M. Barker⁶, Rosa Diaz⁴, Julio Alvarez^{2*}



CrossMark

click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: de la Cruz ML, Perez A, Bezos J, Pages E, Casal C, et al. (2014) Spatial Dynamics of Bovine Tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010–2012). PLoS ONE 9(12): e115632. doi:10.1371/journal.pone.0115632

Editor: Christophe Sola, Institut de Génétique et Microbiologie, France

Received: April 21, 2014

Accepted: November 5, 2014

Published: December 23, 2014

Copyright: © 2014 de la Cruz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that, for approved reasons, some access restrictions apply to the data underlying the findings. Data used in this study are available upon request to the official veterinary services of the Autonomous Community of Madrid but cannot be made freely available to the general public due to legal restrictions. The reason for this is that data used here come from the official records of the bovine tuberculosis eradication campaigns in the region of Madrid, and contains private information that cannot be disclosed without the individual agreement of each of the farmers tested in the eradication program. Data may be provided to any interested party that request it to the official veterinary services provided that any information that could lead to the individual identification of a given farm (such as its individual spatial location - coordinates - or the results of any individual herd tests) is conveniently removed. Aggregated data at the county/year level can be shared without any inconvenience if a request is made. Requests should be directed to the head of the livestock area of the regional government of the Autonomous Community of Madrid, Ms. Rosa Diaz (rosa.diaz@madrid.org).

1. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense, Madrid, Spain, **2.** Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, United States of America, **3.** MAEVA SERVET SL, Alameda del Valle, Madrid, Spain, **4.** Área de Ganadería, Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain, **5.** Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain, **6.** Center for Vectorborne Diseases and Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, California, United States of America

* jalvarez@umn.edu

Abstract

Progress in control of bovine tuberculosis (bTB) is often not uniform, usually due to the effect of one or more sometimes unknown epidemiological factors impairing the success of eradication programs. Use of spatial analysis can help to identify clusters of persistence of disease, leading to the identification of these factors thus allowing the implementation of targeted control measures, and may provide some insights of disease transmission, particularly when combined with molecular typing techniques. Here, the spatial dynamics of bTB in a high prevalence region of Spain were assessed during a three year period (2010–2012) using data from the eradication campaigns to detect clusters of positive bTB herds and of those infected with certain *Mycobacterium bovis* strains (characterized using spoligotyping and VNTR typing). In addition, the within-herd transmission coefficient (β) was estimated in infected herds and its spatial distribution and association with other potential outbreak and herd variables was evaluated. Significant clustering of positive herds was identified in the three years of the study in the same location ("high risk area"). Three spoligotypes (SB0339, SB0121 and SB1142) accounted for >70% of the outbreaks detected in the three years. VNTR subtyping revealed the presence of few but highly prevalent strains within the high risk area, suggesting maintained transmission in the area. The spatial autocorrelation found in the distribution of the estimated within-herd transmission coefficients in herds located within distances <14 km and the results of the spatial

Funding: This project was partly supported by Agriculture and Food Research Initiative Competitive Grant no. 2013-67015-21244 from the USDA National Institute of Food and Agriculture. CMB also acknowledges support from the Research and Policy for Infectious Disease Dynamics program of the Science and Technology Directorate, Department of Homeland Security and the Fogarty International Center, National Institutes of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr. Bezos is currently affiliated with MAEVA SERVET SL, but this affiliation does not represent any competing interest with the results reported here and does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

regression analysis, support the hypothesis of shared local factors affecting disease transmission in farms located at a close proximity.

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by members of *Mycobacterium tuberculosis* complex (mainly *M. bovis*, and to a lesser extent, *M. caprae*) is an important zoonotic disease with a global distribution that has major implications for both animal and human health [1]. Implementation of eradication programs, mainly through test-and-slaughter strategies, has led to a significant decrease of the prevalence and even to disease eradication in many developed countries [2, 3]. However, success of eradication programs is not uniform, leading to the persistence of bTB in certain areas, usually associated with the presence of one or more known risk factors, such as wildlife reservoir, large herds, or extensive management that complicates animal testing [4–6].

The efficacy of eradication programs may be improved by using spatial statistics to detect clusters of persistent infection and consequently targeting control efforts to those high risk clusters [7], as shown previously for bovine tuberculosis in livestock [8, 9] and wildlife [10, 11]. Spatial analysis can be particularly powerful when combined with molecular typing techniques, such as spoligotyping [12], and MIRU-VNTR typing [13], which can provide critical information on the spatio-temporal patterns of pathogen transmission [14]. The use of those techniques has provided useful information of the distribution of *M. bovis*/*M. caprae* in a number of countries [15–18], demonstrated the transmission between livestock and wildlife [19], and provided useful information at a regional/local scale [11]. Strain-related differences in terms of transmissibility and/or virulence has been also suggested [20].

In Spain, a national bTB eradication program has been in place since 1987, resulting in a marked decrease of bTB herd prevalence (from 11.4% in 1986 to 1.31% in 2012), although progress has been heterogeneous. This program is nowadays based on yearly skin testing of every ≥ 6 weeks old animal, parallel use of the interferon-gamma (IFN- γ) assay as an ancillary diagnostic test in infected herds, slaughter of all reactors, control of livestock movement, slaughterhouse surveillance and monitoring, and control measures in wildlife reservoirs [21]. Despite the program's success, the disease is still present at levels of concern in some areas, such as the Autonomous Community of Madrid (ACM) [21], in which a special incidence area was recently declared [22], thus suggesting the presence of factors impairing the progress of the eradication campaigns.

In the present study, a spatial analysis was carried out using bTB data collected in the ACM during a three-year period (2010–2012) with the objective of identifying clusters of farms at high risk of disease. In addition, information on the molecular profiles of the *M. tuberculosis* complex strains isolated from cattle

during the study was used to identify highly prevalent strains associated with persistent local transmission. Finally, differences in the within-herd transmission coefficients estimated at a herd level in infected herds were also assessed, as well as possible factors associated with high rates of disease transmission. Results found here will help to evaluate the progress of bTB control in ACM and to support the design and implementation of effective eradication programs in the regions.

Materials and Methods

1. Study population

The ACM, located in central Spain, covers an area of 8,022 km², with a mean altitude of 650 m and a continental-Mediterranean climate. During the 2010–2012 study period, ACM was home to 1,496 cattle herds that were tested at least once during the 3 year study period in the frame of the eradication program. Only herds for which the spatial location (coordinates) was available to us ($n=1,387$, 92.7%) were included in the study (Fig. 1). The predominant production type was beef (83.3% of the herds), followed by bullfighting (6.9%) and dairy (6.1%), whereas the remaining herds (<4%) were of mixed types. Information included in the study was exclusively derived from the work performed in the frame of the eradication programs, and thus no experimental research on animals was performed.

2. *In-vivo* tuberculosis diagnostic tests

All active cattle herds included in the program were subjected to at least one annual herd test using the single intradermal tuberculin (SIT) test according to the European and Spanish regulations [23, 24]. SIT tests were performed by field practitioners in all animals >6 weeks old by inoculation of 0.1 mg of the official bovine PPD (CZ Veterinaria, Porriño, Spain) in the left side of the neck. After 72 hours, animals with an increase of the skin fold thickness >2 mm were considered reactors (severe interpretation). In addition, animals >6 months old from positive herds (in which the infection was confirmed by detection of lesions, culture and/or epidemiological evidences) were also subjected to IFN- γ testing. Hence, the IFN- γ assay was used in those herds as an ancillary test to maximize the number of infected animals detected [23] as described elsewhere [25].

3. Post-mortem laboratory tests

All reactors were subjected to post-mortem analysis to confirm the infection: first, animals were screened to detect macroscopic lesions compatible with bTB in the slaughterhouse. Lesions (if present) or tissue samples (lung and retropharyngeal, bronchial and mediastinal lymph nodes) were collected from all reactors and processed in the laboratory for isolation of *M. tuberculosis* complex members [26]. Isolates were identified as *M. bovis*/*M. caprae* and characterized using spoligotyping [12]. Isolates from the most prevalent spoligotypes in areas of high prevalence were also typed using the Variable Number of Tandem Repeats

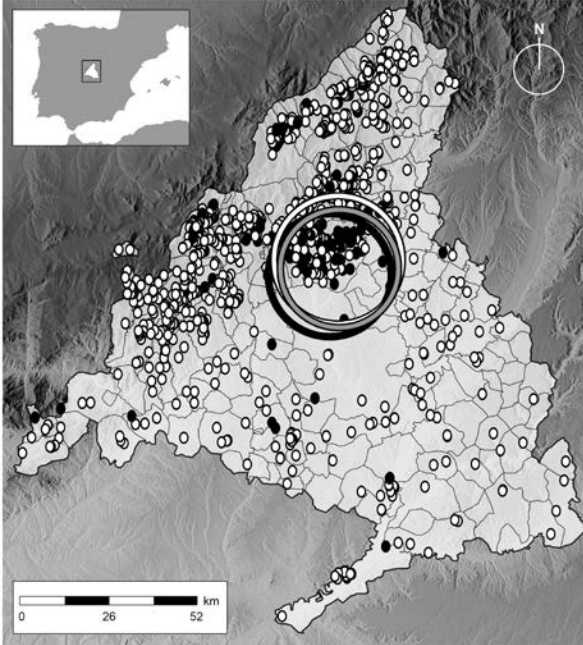


Fig. 1. Location of cattle herds tested in the bTB eradication program during 2010–2012 in the ACM. Black dots indicate herds that were positive at some stage in 2010–2012, and white dots indicate herds consistently negative during the three years. Circles indicate clusters of high risk identified in 2010, 2011 and 2012.

doi:10.1371/journal.pone.0115632.g001

(VNTR) method as described before [13] using four loci (ETR-A, ETR-B, QUB11a and 3232s) (S1 Table) previously described to be highly variable among *M. bovis* isolates from the Iberian peninsula [27,28].

4. Data analysis

Information on the herd type (beef, dairy, bullfighting or other) and census, management (extensive/intensive), location and bTB test results (date, tests

performed, number of animals tested, number of reactors at each test, number of *M. bovis*/*M. caprae* positive cultures, spoligotype/VNTR profiles found) during 2010–2012 were collected at the herd level from the official veterinary services and the MycoDB (<http://www.mycodb.es>) databases. Positive herds were those in which at least one reactor at the SIT test and/or the IFN- γ assay was disclosed in a herd-test during the study period. An outbreak was defined as the time period from first disclosure of a bTB reactor until the herd had recovered its official bTB-free (OTF) status. Proportions and quantitative outcomes obtained in different groups/clusters were compared using non-parametric tests (chi-square test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test). The evolution of the herd prevalence in the ACM was evaluated using the Cochran-and-Armitage and Mantel tests for lineal trend. Cochran–Orcutt procedure was applied to control serial correlation [29]. The discriminatory power (D) of spoligotyping and combined spoligo-VNTR typing, defined as the average probability that each technique will allocate two isolates randomly sampled from a population in two different groups, was calculated using the Hunter and Gaston equation [30]. For the analysis each different profile obtained from a given herd was counted once regardless the number of typed isolates sharing the same profile.

Clustering of positive herds/prevalent molecular profiles was assessed using the Bernoulli model of the spatial scan statistic. This model compares the observed number of bTB-positive herds within all possible circular spatial windows in the study area with the expected number of cases under the null hypothesis of random distribution of positive herds [31]. We limited candidate clusters to 50% of the total herds, and the region was scanned for areas at high and low risk for the disease. The test was implemented using the SaTScan software version 9.1.1 [32].

In addition, we estimated the transmission coefficient (β , the average number of animals infected from an infectious individual per unit of time) [33,34] in positive herds with sufficient available information (date of first positive herd-test, size of the herds, and number of reactors at each diagnostic test). Estimates for β were calculated at the herd level as previously described with a slight modification: the sensitivity and specificity of the *in-vivo* diagnostic tests were assumed to range from 0.632 to 0.839 and 0.755 to 0.968, respectively, in agreement with previous findings in a similar epidemiological setting as the one studied here [35]. Values of β were computed after 1000 simulations using @RISK 5.5 (Palisade Co, Ithaca, NY, USA).

Incremental spatial autocorrelation (ISA) of the log-transformed β coefficients in the region was evaluated at increasing distances up to 22 km using Moran's I [36]. Before autocorrelation was assessed, spatially isolated herds (defined as herds separated from their nearest neighbor by more than three standard deviations of the nearest-neighbor distances for all herds) were removed. When Moran's I detected significant autocorrelation, the locations of any clusters were identified using the Getis-Ord G^* statistic [37], which compared local β values (for each herd and its neighbors within various distance bands) with global values to identify areas with β values that were higher ("hot spots") or lower than expected ("cold spots"). All autocorrelation tests were carried out using the Spatial

Statistics Tools implemented in ArcGIS 10.1 SP1 (ESRI, Redlands, California, USA).

Possible association between the herd-level factors and the log-transformed β coefficient for each herd were identified using simple linear regression. Potentially significant ($p < 0.3$) covariates were then included as main effects in a multiple regression model including significant ($p < 0.05$) scientifically sound two-way interactions. The final model was selected by an all-possible-subset regression algorithm using the C_p criterion developed by Mallows [38]. Residuals of the final model were analyzed for spatial autocorrelation using Moran's test [36] to determine whether any spatial autocorrelation detected by the ISA above had been explained by the model for herd-level factors. For this analysis, the neighborhood for each herd was defined by the ISA distance band identified above with inverse-distance weighting between herds. When significant residual spatial autocorrelation was found, a conditional autoregressive (CAR) model [39] was fitted using the same covariates [40]. Regression analyses were carried out using R [41] and the *spdep* package for CAR models [42].

Results

1. Distribution of bTB-positive farms

Herd-level prevalence (number of positive herds) was 5.5% ($n=72$), 7.3% ($n=94$), and 5.9% ($n=80$) in 2010, 2011, and 2012 respectively, providing a non-significant trend for the evolution of the herd prevalence in the three-year period of study ($p > 0.05$). Herd prevalence was not associated with production type (Chi-square test, $p > 0.05$).

High risk clusters ($p < 0.05$) were identified at approximately the same spatial location in each of the three years of study (Fig 1, Table 1). Up to 230 herds (16.6% of those included in the study) were included in a significant cluster at least once during the study period, 157 of which were consistently found in the area in which all three clusters overlapped (defined as "high risk area" from now on). A significantly higher proportion of bullfighting herds were found in the 230 herds included at least once in a significant cluster compared with the rest of the population (10.9% vs. 6.1%, Chi-square test, $p = 0.012$) although this difference became non-significant when the group was narrowed to include only the 157 herds consistently found in the high risk area ($p = 0.12$). No significant differences were observed in the herd size depending on the location (inside/outside high risk areas) (Mann-Whitney test, $p = 0.3$).

2. Molecular characterization of bTB outbreaks

At least one positive *M. bovis* culture was obtained and characterized in 76.4% (55/72), 73.4% (69/94) and 72.5% (58/80) of the positive herds detected in 2010, 2011 and 2012 respectively. Overall *M. bovis* spoligotypes were available for 129 (72.9%) of the 179 herds that were positive at some stage during the study period;

Table 1. Significant ($p < 0.05$) clusters of bovine tuberculosis-positive herds found in each year during the period 2010–2012 in the Autonomous Community of Madrid.

Year	Radius (km)	Included herds	Cases Observed	Cases Expected	RR ^a	P-value
2010	14.6	217	37	11.9	5.35	<0.001
2011	13.4	154	56	11.3	10.8	<0.001
2012	14.0	144	43	9.15	9.00	<0.001

^a Relative risk within the cluster.

doi:10.1371/journal.pone.0115632.t001

in 64 of them more than one (and up to seven) different spoligotype profiles were detected. A total of 30 spoligotypes were found, with three profiles accounting for >70% of the profiles found every year (SB0339: 36.0%; SB0121: 20.2%; and SB1142: 17.4%). The discriminatory index at the herd level was $D=0.81$. A significant cluster of high prevalence ($p=0.027$) was only found for SB1142, comprising most of the isolates located in the high risk area and in fact isolates belonging to this spoligotype were found significantly (Chi-square test, $p=0.001$) more often within the high risk area than outside (with 85.7% of all the SB1142 spoligotypes identified in the ACM found within this area). The discriminatory index obtained including herds located in the high risk area was $D=0.75$.

Two-hundred and eighteen isolates belonging to the three most prevalent spoligotypes in the high risk area (SB0339, $n=112$; SB0121, $n=61$ and SB1142, $n=45$), recovered in the 2010–2012 period from 53 different herds, were subjected to VNTR-typing (1–18 VNTR-typed isolates per herd). Fifteen of these 53 herds were positive at least two years during the study period. The three spoligotypes were subdivided into 24 different combined spoligotype-VNTR patterns. Spoligotypes SB0339 and SB1142 were subdivided into eight and four VNTR subtypes respectively, although one of them accounted for the majority of the isolates (MV0006 for SB0339, present in 72/112 (64.3%) of the isolates, and MV0003, found in 41/45 (91.1%) SB1142 isolates) (S1 Table). In contrast, SB0121 was further subdivided into 12 VNTR types, of which MV0001 and MV0074, the most abundant, were observed in only 16 (26.2%) isolates each of the 61 SB0121 typed strains (S1 Table). No significant ($p > 0.05$) clustering of any spoligotype-VNTR pattern was identified within the high risk area. At the herd level the discriminatory index for the combination of spoligotyping and VNTR in the high risk area was 0.83.

More than one spoligotype-VNTR profile was observed in 22 (41.5%) of the 53 herds in the high risk area. In 12 of the 15 recurrently positive herds (positive at least two years) in 2010–2012 more than one profile was found (OR compared with non-recurrently positive herds = 11.2, 95% CI = 2.6–48).

3. Spatial distribution of the β coefficient

Estimated within-herd transmission coefficients, β , were available for 152 bTB outbreaks in 142 cattle herds during 2010–2012 in Madrid, of which 143 occurred in 133 cattle herds (114 beef, 13 dairy and 6 bullfighting) with a known spatial

location. Sixty-one of these herds were located within the high risk area. The median β estimate was 4.42 (IQR=2.62–6.29). No significant differences were found between locations of the outbreaks (within/outside the high risk area; Mann-Whitney test, $p=0.6$) or production types (Kruskal-Wallis test, $p=0.25$). In contrast, β was significantly higher (Mann-Whitney test, $p<0.001$) in herds in which the IFN- γ assay had been applied ($n=87$, median $\beta=4.85$) compared to those where only the SIT test was used ($n=46$, median $\beta=2.6$) and in those where *M. bovis* was isolated ($n=100$, median $\beta=4.67$) compared with those where it was not ($n=33$, $\beta=2.58$).

The analysis of the log-transformed β s estimated in herds from the whole ACM ($n=133$) suggested the absence of clustered transmission dynamics (Moran's $I=0.40$, $Z=1.32$, $p=0.19$) once spatial outliers ($n=6$) were removed. Still, incremental spatial autocorrelation analysis revealed that most clustering, although not significant ($p=0.09$), occurred at 14 km. When the analysis was performed using only infected herds located in the high risk area ($n=60$), incremental spatial correlation analysis of the log-transformed β s revealed the occurrence of highly significant positive autocorrelation ($p=0.0003$ – 0.036) between 6 and 14 km distance with a peak at 12 km (Fig. 2). In the high risk area, Getis-Ord G_i^* revealed the presence of hot and cold spots with unexpectedly high and low log-transformed β values ($p<0.05$) in the western and eastern parts of the area respectively, including 5 and 7 herds (Fig. 3).

4. Regression analysis

Bivariate linear regressions using data from all the ACM failed to identify any herd- or management-related variable associated with disease. However, there were six bTB-related variables as potentially ($p<0.3$) associated with the log-transformed β coefficient: number of reactors in the first herd test, number of positive herd-tests in the outbreak, use of IFN- γ , isolation of *M. bovis* during the outbreak, number of spoligotypes present and existence of previous outbreaks). The final multivariable model included only the number of reactors in the first herd-test, use of IFN- γ assay, isolation of *M. bovis* and the interaction between the latter two (Table 2). Moran's I test for spatial autocorrelation in residuals from this model did not detect any evidence of spatial correlation ($p=0.20$).

Bivariate analysis of data from herds located in the high risk area identified a slightly different set of production (management type and categorized census) and outbreak-associated (number of reactors in the first herd test, use of IFN- γ , isolation of *M. bovis* during the outbreak and existence of previous outbreaks) variables as potentially associated with the log-transformed β coefficient. The final model included only number of positive reactors in the first herd test, isolation of *M. bovis* and existence of previous outbreaks. However, in this case Moran's I test for spatial autocorrelation in residuals from the model suggested the presence of spatial correlation ($p=0.06$). Consequently, a CAR model was fitted, which resulted in controlling for spatial autocorrelation ($\lambda=6.69 \times 10^{-5}$, $p=0.15$) (Table 2).

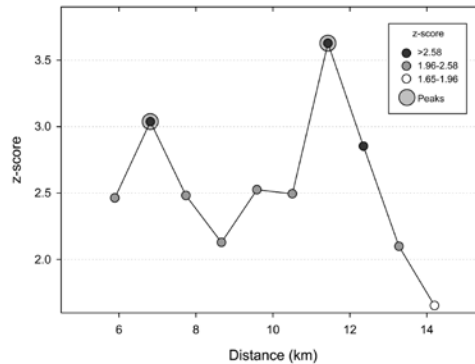


Fig. 2. ISA of the log-transformed β coefficient of bTB-infected herds located in a high risk area ($n=60$) in the ACM in 2010–2012.

doi:10.1371/journal.pone.0115632.g002

Discussion

Despite the efforts and funds invested on bTB control programs, disease eradication from the cattle population still remains a challenge in many developed countries. Even within a single country, the results of national eradication programs may be highly variable. This heterogeneity is often linked to the presence of a significant wildlife reservoir that maintains the infection [43], but may occur also in areas such as the ACM in which prevalence of infection in the potential wildlife reservoir species present, the wild boar, is considered low. Here, we analyzed the spatial variation in bTB within the ACM to describe risk patterns and determine the causes of departures from typical transmission levels within the region.

Data from a last three-year period (2010–2012) revealed a consistent cluster of high prevalence (Fig. 1). This is not surprising, given the considerable time required for regaining the OTF status in infected herds, with a median duration of 307 days in the period 2006–2012 in the same region [35]. The lack of additional clusters in other areas in which estimates of wild boar density are similar or higher than in the high risk area [44, 45] suggest that at least this is not the only factor playing a role in the maintenance of bTB in the region.

Given the limitations of bTB diagnostic techniques, isolation of the causative agent is desirable (and usually required) to confirm the infection at the herd level. In this study, we were able to confirm the infection in 75.6% of the positive herds, and at least one isolate was characterized using spoligotyping in 96.9% of them

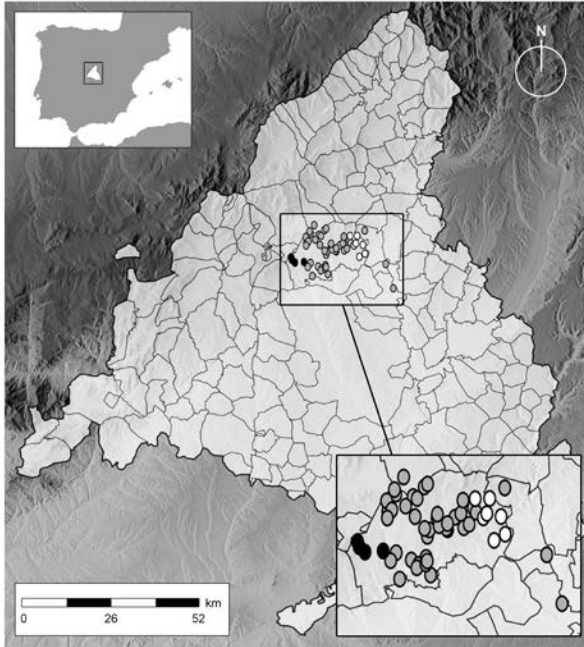


Fig. 3. Cluster of herds showing significantly ($p < 0.05$) low (black dots) or high (white dots) values for the log-transformed β coefficient as determined by Getis-Ord G^* , within a high risk area of the ACM.

doi:10.1371/journal.pone.0115632.g003

(approximately 73% of all detected outbreaks). Molecular typing data revealed the presence of three highly prevalent spoligotypes in the region, two of which (SB0121 and SB0339) are among the 15 most abundant profiles in a database of *M. bovis* isolates collected throughout all Spain in 1992–2007 [15]. Discriminatory power of spoligotyping in the region was lower than that described for the whole country ($D=0.81$ vs. $D=0.87$) [15]. In fact, finding that more than 70% of the profiles belonged to just three spoligotypes highlights the limitations of this technique for epidemiological purposes. This is particularly true when

Table 2. Point estimates, standard errors (S.E.) and 95% confidence intervals (95% CI) of the regression coefficients (β) and P-value of the variables remaining in the final models measuring the association between herd-level covariates and the log-transformed within-herd transmission coefficient for all infected herds located in the Autonomous Community of Madrid in 2010–2012 (n=246) and infected herds located in a high risk area (n=65).

Population studied	Variable	β	S.E.	P
All herds	reactors in first herd-test	0.047	0.008	<0.001
	use of IFN- γ	0.397	0.095	<0.001
	History of previous outbreaks	-0.211	0.109	0.05
Herds in high risk area	reactors in first herd-test	0.054	0.009	<0.001
	Isolation of <i>M. bovis</i>	0.574	0.203	0.006
	History of previous outbreaks	-0.255	0.133	0.06

doi:10.1371/journal.pone.0115632.t002

spoligotypes highly prevalent at the country level are found [46], as with no further information it is impossible to conclude if finding them is due to the recirculation of a limited number of highly prevalent strains or to a lack of discriminatory power of the technique.

For this reason isolates belonging to the three most prevalent spoligotypes in the high risk area were further subtyped using VNTR analysis. However, although the use of VNTR subtyping increased the discriminatory ability, a considerable genetic homogeneity was still found for SB0339 and SB1142 (with one spoligo-VNTR pattern accounting for 60–90% of the isolates) (S1 Table). The larger variability in isolates with a SB0121 spoligotype found here was in agreement with a previous study in which a panel of 115 SB0121 *M. bovis* isolates was further divided in 65 VNTR profiles [28]. Still, a more limited variability was observed here ($D=0.83$ compared with $D=0.99$), probably related with the increased probability of finding isolates epidemiologically related. At the national level SB0339 and SB1142 are found predominantly in the ACM (up to November 2013 52% and 78.2% of all typed isolates belonging to these profiles were coming from cattle located in this region according to the Spanish database of animal mycobacteriosis) [47]. Therefore, the limited genetic variability found in those spoligotypes may reflect the endemicity of a reduced number of spoligo-VNTR types widely distributed in the region. On the other hand, the higher heterogeneity found in isolates from the SB0121 spoligotype, the most abundant in the Iberian Peninsula [48, 15], could be a consequence of several different and unrelated introductions of *M. bovis* strains from other regions of the country. Thus, usefulness in outbreak investigation of VNTR to determine the potential relatedness of isolates with an epidemiological link would be highly dependent on the spoligotype of the isolates being typed. Still, the association between a higher number of spoligo-VNTR patterns found in a given herd and its positivity for at least two years in 2010–2012 suggests that recurrence of bTB in the herd in this three-year period may be related not only with persistence of infection but also to exogenous introductions of different *M. bovis* strains.

Within-herd transmission coefficient estimates found in the present study were in line with those obtained in the ACM [35] and elsewhere [49–51]. Horizontal transmission of bTB is considered to be low under normal circumstances, but

certain management factors (such as herd size and density, or lack of hygienic measures in place) may contribute to increase the cattle-to-cattle transmission [52, 53]. In addition, the ancillary use of more sensitive diagnostic techniques, such as the IFN- γ detection assay, may induce an increase in the number of positive animals being detected, yielding an apparent increased transmission within a herd [35]. Therefore finding herd and outbreak-related variables potentially associated with the β estimate in a given herd was not an unexpected finding. Final models selected only variables associated with the outbreak (use of IFN- γ , number of reactors found in the first positive herd test and history of previous bTB outbreaks for the whole region and reactors in the first herd, history of previous outbreaks and isolation of *M. bovis* in the herd for the high risk area) reflecting the expected strong impact of increased number of reactors and of confirming the infection in the method used for β estimation. Although a prior history of disease in the herd has been associated previously with an increased risk of future outbreaks [54], here it was associated with a decreased estimate of β (both in the whole ACM and the high risk area) (Table 2). This would suggest that transmission was particularly low in herds experiencing repeated outbreaks compared with the rest of infected farms present in the region during the study period. Possible explanations for such finding include the presence of an increased rate of false-negative reactors in these farms (that could lead to an incorrectly lower estimate of within-herd transmission) or anergic infected cattle that would originate the different outbreaks. Interestingly the genetic profile of the isolate was not associated with the estimated transmission at the herd level; this could be due to a lack of strain-dependent differences in the transmissibility of a given strain or to the effect of the test-and-cull strategies that would hamper the expression of these differences at demonstrable levels [20].

The spatial pattern of the β coefficient across the region and particularly in the high risk area revealed a significant effect of the location of the herds in their estimates. A strong positive autocorrelation was found at low distances (<14 km) suggesting that the intensity of transmission within neighboring herds was similar. Such result may be due to a shared contact network (between-herd contacts in shared pastures, controlled and uncontrolled local cattle movements, exposure to infected wildlife or other as yet unidentified local source in herds located in the same vicinity). Neighboring contacts can be highly variable between and within regions [55], and no information was available here to further characterize the contact networks between farms in the ACM. However, the lack of autocorrelation in the residuals of the best model found for the whole region suggests that at the regional level variables included in the final model (use of IFN- γ assay, number of reactors in the first herd test and previous history of bovine tuberculosis) may account for the majority of the spatial variation of the β coefficient. At a local scale in the high risk area, evidences suggesting the existence of autocorrelation in the residuals of the best linear regression model led to the use of a CAR model, selected due to its best fit for situations with relatively local spatial autocorrelation [56], as those shown by the incremental spatial autocorrelation analysis here. The lack of autocorrelation in the residuals once the

CAR model was fit supports the hypothesis of shared local factors affecting disease transmission in farms located at a close proximity (<14 km) within the high risk area.

In summary, bTB was unevenly distributed in the ACM, with a cluster of increased incidence being present in 2010–2012. Most cases (>70%) detected in the region were due to three spoligotypes (SB0339, SB0121 and SB1142). VNTR analysis of isolates from the high risk area belonging to these profiles revealed a high genetic homogeneity of isolates belonging to SB0339 and SB1142, thus suggesting a wide distribution of certain strains with a sustained transmission in the area. Within-herd transmission coefficient estimates were in agreement with those reported earlier for the same area, but the strong spatial dependence between the data, particularly in the high risk area, found at distances <14 km further supports the hypothesis of local transmission of strains between neighbor herds, or from a common source. These results will help to evaluate progress and to increase the effectiveness of bTB control programs in the region.

Supporting Information

S1 Table. VNTR subtypes of the three more prevalent spoligotypes recovered from the high risk area during the study period.

[doi:10.1371/journal.pone.0115632.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115632.s001) (DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LD RD JA JC. Performed the experiments: MC JB EP CC BR. Analyzed the data: MC AP CB JA. Contributed reagents/materials/analysis tools: EP BR RD LD. Wrote the paper: MC AP CB JA.

References

1. Collins JD (2006) Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Vet Microbiol* 112: 369–381.
2. Cousins DV, Roberts JL (2001) Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 5–15.
3. European Food Safety Authority (EFSA) ECIDPaCE (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11: 1–250.
4. Humblet MF, Boschirolli ML, Saegerman C (2009) Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 40: 50.
5. Menzies FD, Neill SD (2000) Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 160: 92–106.
6. Ramirez-Villaescusa AM, Medley GF, Mason S, Green LE (2009) Herd and individual animal risks associated with bovine tuberculosis skin test positivity in cattle in herds in south west England. *Prev Vet Med* 92: 188–196.
7. Ward MP, Carpenter TE (2000) Analysis of time-space clustering in veterinary epidemiology. *Prev Vet Med* 43: 225–237.

8. Allepuz A, Casal J, Napp S, Saez M, Alba A, et al. (2011) Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006–2009). *Prev Vet Med* 100: 44–52.
9. Perez AM, Ward MP, Torres P, Ritacco V (2002) Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev Vet Med* 56: 63–74.
10. Olea-Popelka FJ, Griffin JM, Collins JD, McGrath G, Martin SW (2003) Bovine tuberculosis in badgers in four areas in Ireland: does tuberculosis cluster? *Prev Vet Med* 59: 103–111.
11. Olea-Popelka FJ, Flynn O, Costello E, McGrath G, Collins JD, et al. (2005) Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. *Prev Vet Med* 71: 57–70.
12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van AM, van SD, et al. (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907–914.
13. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 (Pt 5): 1189–1196.
14. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD (1993) Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 17: 153–162.
15. Rodríguez S, Romero B, Bezos J, De JL, Alvarez J, et al. (2010) High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol* 141: 89–95.
16. Rodríguez S, Bezos J, Romero B, De JL, Alvarez J, et al. (2011) *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis* 17: 532–535.
17. Smith NH, Berg S, Dale J, Allen A, Rodríguez S, et al. (2011) European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect Genet Evol* 11: 1340–1351.
18. Smith NH (2012) The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect Genet Evol* 12: 857–866.
19. Romero B, Aranz A, Sandoval A, Alvarez J, De JL, et al. (2008) Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. *Vet Microbiol* 132: 87–95.
20. Wright DM, Allen AR, Mallon TR, McDowell SW, Bishop SC, et al. (2013) Field-isolated genotypes of *Mycobacterium bovis* vary in virulence and influence case pathology but do not affect outbreak size. *PLoS One* 8: 74503.
21. Ministerio de Agricultura AyMA (2013) Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina presentado por España para el año 2013. Available: <http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/2013/TUBERCULOSIS%20BOVINA/PROGRAMA%20TB%202013.PDF>.
22. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio C (2013) Resolución de 19 de marzo de 2013. BOCM 73: 77–79.
23. Anon. (2006) Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU accepted by the Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication. SANCO/10200/2006.
24. Real Decreto 2611/1996, de 20 diciembre (1996) "por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales". BOE: 307: 38115–33.
25. Alvarez J, Perez A, Bezos J, Marques S, Grau A, et al. (2011) Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 155: 38–43.
26. 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.
27. Duarte EL, Domingos M, Amado A, Cunha MV, Botelho A (2010) MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Vet Microbiol* 143: 299–306.

28. **Rodríguez-Campos S, Navarro Y, Romero B, De JL, Bezos J, et al.** (2013) Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J Clin Microbiol* 51: 3658–3665.
29. **Cochrane D, Orcutt GH** (1949) Application of Least Squares Regression to Relationships Containing Auto-Correlated Error Terms. *J-Am-STAT-Assoc*, 44: 32–61.
30. **Hunter PR, Gaston MA** (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465–2468.
31. **Kulldorff M, Nagarwalla N** (1995) Spatial disease clusters: detection and inference. *Stat Med* 14: 799–810.
32. **Kulldorff M, Information Management Services I** (2009) SaTScan TM v8.0. Software for the spatial and space-time scan statistics. Available: <http://www.satscan.org/>.
33. **Begon M, Bennett M, Bowers RG, French NP, Hazel SM, et al.** (2002) A clarification of transmission terms in host-microparasite models: numbers, densities and areas. *Epidemiol Infect* 129: 147–153.
34. **de Jong MCM** (1995) Mathematical modelling in veterinary epidemiology: why model building is important. *Prev Vet Med* 25: 183–193.
35. **Alvarez J, Perez AM, Bezos J, Casal C, Romero B, et al.** (2012) Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 year period. *BMC Vet Res* 8: 100.
36. **Moran PA** (1950) Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 37: 17–23.
37. **Ord JK, Getis A** (1995) Local spatial autocorrelation statistics: distributional issues and an application. *Geographical analysis* 27: 286–306.
38. **Mallows CL** (1973) Some comments on Cp. *Technometrics* 15: 676.
39. **Schabenberger O, Gotway CA** (2005) *Statistical methods for spatial data analysis*. London: Chapman & Hall.
40. **Bivand RS, Pebesma EJ, Gomez-Rubio V** (2008) *Applied spatial data analysis with R*. Springer Science+Business Media.
41. **R development core team** (2011) *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria.
42. **Bivand R** (2011) spdep: spatial dependence: weighting schemes, statistics and models. <http://CRAN.R-project.org/package=spdep>.
43. **Pfeiffer DU** (2013) Epidemiology caught in the causal web of bovine tuberculosis. *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 1: 104–110.
44. **Bosch J, Paris S, Fonseca C, Martínez M, de la Torre A, et al.** (2012) Distribution, abundance and density of the wild boar on the Iberian Peninsula, based on the CORINE program and hunting statistics. *Folia Zoologica* 61: 138–151.
45. **Acevedo P, Quirós-Fernández F, Casal J, Vicente J** (2014) Spatial distribution of wild boar population abundance: Basic information for spatial epidemiology and wildlife management. *Ecol Indic* 36: 594–600.
46. **Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith NH, Gordon SV** (2006) Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol* 112: 127–139.
47. **Rodríguez-Campos S, Gonzalez S, De JL, Romero B, Bezos J, et al.** (2012) A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infect Genet Evol* 12: 877–882.
48. **Duarte EL, Domingos M, Amado A, Botelho A** (2008) Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet Microbiol* 130: 415–421.
49. **Barlow ND, Kean JM, Hickling G, Livingstone PG, Robson AB** (1997) A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. *Prev Vet Med* 32: 67–75.
50. **Fischer EA, van Roermund HJ, Hemenik L, van Asseldonk MA, de Jong MC** (2005) Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. *Prev Vet Med* 67: 283–301.

51. **Perez AM, Ward MP, Charmandarian A, Ritacco V** (2002) Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. *Prev Vet Med* 54: 361–372.
52. **Goodchild AV, Clifton-Hadley RS** (2001) Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 23–41.
53. **Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R** (2003) The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* 74: 1–15.
54. **Olea-Popeika FJ, White PW, Collins JD, O’Keeffe J, Kelton DF, et al.** (2004) Breakdown severity during a bovine tuberculosis episode as a predictor of future herd breakdowns in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 63: 163–72.
55. **Dommergues L, Rautureau S, Petit E, Dufour B** (2012) Network of contacts between cattle herds in a French area affected by bovine tuberculosis in 2010. *Transbound Emerg Dis* 59: 292–302.
56. **Srinivasan S** (2008) Spatial regression models. In: Shekhar S, Xiong H, editors. *Encyclopedia of GIS*. Springer. pp. 1102–1105.

6.3. Capítulo III

6.3.1. Evaluación de la sensibilidad del Programa de Erradicación de la tuberculosis bovina en una región de alta prevalencia de España mediante un árbol de escenario

En España, el programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina (bTB) se basa actualmente en la intradermotuberculinización (IDTB) rutinaria de animales mayores de semanas y el uso en paralelo de la prueba del gamma-interferón en explotaciones infectadas, además de la vigilancia en matadero y el control de los reservorios salvajes. El éxito de este programa en la reducción de la prevalencia de bTB está limitado, en parte, por el hecho de que las pruebas diagnósticas disponibles no son capaces de determinar correctamente el estado de infección por su agente causal en un porcentaje de las vacas analizadas, por lo que la prevalencia aparente (proporción de animales positivos a las pruebas) puede diferir de la prevalencia real (proporción de animales infectados). Esto puede dar lugar a una clasificación incorrecta de las explotaciones infectadas como oficialmente libres de bTB (OTF) debido a la ausencia de reactores, especialmente cuando una prueba de limitada sensibilidad como la IDTB se emplea como prueba de cribado.

Por todo lo anterior, se tomó la decisión de evaluar la sensibilidad de rebaño (*HSe*) del programa actual de erradicación de la bTB en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, región con mayor censo bovino del país, empleando un árbol de escenario. La *HSe* se define como la probabilidad de identificar mínimo un animal reactor a una prueba diagnóstica aplicada en una población verdaderamente infectada. Para alcanzar este objetivo, primero se desarrolló un árbol de escenario que reflejara el esquema diagnóstico oficial establecido en explotaciones OTF. A continuación, el rendimiento del modelo fue evaluado mediante la comparación del número de reactores a la IDTB y el número de animales positivos en el análisis bacteriológico en explotaciones recién infectadas predicho por el modelo con el observado en explotaciones recién infectadas y detectadas en Castilla

y León en el periodo 2011-2015. Una vez que este modelo estuvo validado, se empleó para estimar la *HSe* esperada y, por consiguiente, el nivel de enfermedad que permanece sin detectar por la campaña diagnóstica actual.

La *HSe* estimada de la IDTB simple (SIT) con interpretación severa en explotaciones con una baja prevalencia intra-rebaño fue moderada (mediana= 76,2%) sugiriendo que aproximadamente tres de cada cuatro explotaciones recién infectadas serían detectadas mediante esta prueba. Por otro lado, la probabilidad de confirmación de estas explotaciones (previamente positivas a SIT) a través del análisis bacteriológico se situó en torno al 65%. Sin embargo, la probabilidad estimada de que estas explotaciones infectadas no confirmadas recuperasen la calificación OTF tras los dos siguientes saneamientos consecutivos (es decir, ningún reactor a SIT observado) fue del 8,7%.

Estos resultados resaltan la importancia de la vigilancia en matadero en el sacrificio rutinario de animales procedentes de explotaciones OTF, así como de las medidas de control impuestas en explotaciones positivas, aunque no confirmadas, como es la restricción del movimiento de animales y la revisión del estado de la explotación mediante saneamientos adicionales.

Manuscript Details

Manuscript number	PREVET_2018_561
Title	Bovine tuberculosis, Cattle, Herd Sensitivity, Scenario Tree Modelling, Diagnosis, Surveillance.
Article type	Research Paper

Abstract

In spite of the efforts invested to eradicate bovine tuberculosis (bTB) in cattle, the disease is still present in several developed countries, including Spain. Among the factors related with disease persistence in high prevalence areas, the lack of sensitivity of the screening test for detection of infected herds [single intradermal tuberculin (SIT) test] can play a major role. Here, a scenario tree model mimicking the diagnostic test scheme in place in the region of Castilla y Leon (Spain) was developed to estimate the probability of detecting bTB in a newly infected officially tuberculosis free (OTF) herd (herd sensitivity, HSe). In order to do so the probability of detecting at least one positive animal in the SIT test with/without post-mortem (detection of lesions and culture) confirmation in a recently infected herd was estimated using Monte Carlo simulation through @RISK (Palisade Co, NY, USA). Uncertainty on the accuracy of the diagnostic tests was introduced in the model using distributions based on the literature. The performance of the model was evaluated by comparing the predicted number of SIT/post-mortem positive animals in infected herds with those observed in newly detected bTB-infected herds in the region in 2011-2015. The estimated HSe of the SIT test was 76.2% (95% probability interval: 19.8-97.6). According to the model, bTB infection would be then confirmed through culture in 65.3% (95% PI: 50.0 - 82.3) of the herds detected through the SIT test, so that overall the proportion of newly bTB infected herds in which the infection could be confirmed after the initial SIT test was 49.6% (95% PI: 9.75 - 80.3). The predicted HSe of both SIT test and culture was directly correlated with herd size. Results from the model suggest a moderate but highly variable HSe of the current surveillance system in place for bTB detection in OTF herds located in high prevalence areas, that could be maximized by performing multiple tests within a year as indicated in the Spanish eradication program (with a median SIT HSe of 87% when two consecutive tests were considered). In addition, these results highlight the usefulness of performing subsequent SIT tests to rule out infection in SIT-positive herds even when the causative agent cannot be isolated.

Keywords	Bovine tuberculosis; cattle; herd sensitivity; scenario tree modelling; diagnosis; surveillance.
Taxonomy	Beef Cattle Diagnostics, Beef Cattle Epidemiology, Dairy Cattle Diagnostics, Dairy Cattle Epidemiology
Corresponding Author	Julio Alvarez
Corresponding Author's Institution	University of Minnesota
Order of Authors	María Luisa de la Cruz, Pilar Pozo, Anna Grau, Jesus Nacar, Javier Bezos, Andres Perez, Lucas Dominguez, Jose Luis Saez, Olga Minguez, Lucia de Juan, Julio Alvarez

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter_Scenario Tree bTB CyL_JA.docx [Cover Letter]

Highlights_de la Cruz Scenario Tree bTB CyL.docx [Highlights]

de la Cruz Scenario Tree bTB CyL.docx [Manuscript File]

Figure 1.jpg [Figure]

figure2.tif [Figure]

figure3.tif [Figure]

Figure 4.jpg [Figure]

Supplementary Figure 1.pdf [e-Component]

Supplementary Table 1.pdf [e-Component]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Dr. Julio Álvarez,
VISAVET Animal Health Surveillance Center
University Complutense of Madrid
Avenida Puerta de Hierro S/N
Madrid 28040, Spain.
Phone:0034913944083
E-mail: jalvarez@visavet.ucm.es

Madrid, October 8th, 2018

Dear editor,

We are enclosing the manuscript “**Assessment of the sensitivity of the bovine tuberculosis eradication program in a high prevalence region of Spain using scenario tree modeling**” for you to consider its publication as an original research paper in the Preventive Veterinary Medicine journal. This work is original and is not being considered for publication in any other journal.

Bovine tuberculosis (bTB) is, in spite of the many efforts invested in its prevention, control and eradication, one of the most important diseases affecting livestock in many countries worldwide. One of the main reasons preventing its effective control in high prevalence areas is the limited sensitivity of the screening test for detection of infected herds (typically the intradermal tuberculin test), what can lead to the misclassification of bTB-infected herds as officially tuberculosis free due to the absence of reactors. Here, we developed a scenario tree model mimicking the diagnostic test scheme established in a high prevalence region (Castilla y Leon) in Spain in order to estimate the Herd-Level Detection Sensitivity of the current diagnostic strategy for detection of recently bTB-infected herds. In order to do so, the probability of detecting at least one positive animal in the single intradermal tuberculin (SIT) test with/without post-mortem (detection of lesions and culture) confirmation was estimated using Monte Carlo simulation considering the effect of herd size, and results were later validated using data from the official tuberculosis eradication program in Castilla y Leon.

Our results suggest that, in Castilla y Leon, the SIT test is able to detect in a first herd-test approximately three out of four newly infected herds at a low within-herd prevalence, number that rises to nine out of ten after two consecutive herd-tests carried out in the same herds. On the other hand and according to the model, the bacteriological analysis is able to confirm the presence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex agent causing the disease in approximately two out of three newly infected herds detected

through the SIT test. These results highlight the importance of routine testing of herds considered tuberculosis-free and the usefulness of performing subsequent SIT tests to rule out infection in SIT-positive herds even when the causative agent cannot be isolated.

All authors have contributed significantly to the work and they have read and approved the content of the manuscript. To the best of our knowledge, the manuscript complies with format requirements as specified in the author's guide.

We look forward to your response.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Julio Alvarez', with a long horizontal stroke extending to the right.

Dr. Julio Alvarez

Highlights

- The herd-level sensitivity of the current bTB diagnostic strategy in Spain was assessed
- SIT test can detect 76.2% of newly bTB-infected herds in a first herd-test.
- In 65.3% of newly infected-SIT positive herds the presence of MTC is confirmed by culture.
- 8.7% of infected but not-confirmed herds may regain OTF status after two herd-tests.
- Herd sensitivity of both SIT test and culture directly correlated with herd size.

Assessment of the sensitivity of the bovine tuberculosis eradication program in a high prevalence region of Spain using scenario tree modeling

María Luisa de la Cruz^a, Pilar Pozo^{a,b}, Anna Grau^c, Jesus Nacar^c, Javier Bezos^{a,d},
Andrés Pérez^e, Lucas Domínguez^{a,d}, José Luis Saez^f, Olga Mínguez^e, Lucía de Juan^{a,d},
Julio Álvarez^{a,d,*}

^aVISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Spain;

^bMAEVA SERVET, S.L., Alameda del Valle, Madrid, Spain; ^cDirección General de

Producción Agropecuaria e Infraestructuras Agrarias, Consejería de Agricultura y

Ganadería de la Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; ^dDepartamento de Sanidad

Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain;

^eDepartment of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine,

University of Minnesota, St. Paul, MN (USA); ^fMinisterio de Agricultura y Pesca,

Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain.

*Corresponding author:

Dr. Julio Álvarez

jalvarez@visavet.ucm.es

1 Abstract

2 In spite of the efforts invested to eradicate bovine tuberculosis (bTB) in cattle, the
3 disease is still present in several developed countries, including Spain. Among the
4 factors related with disease persistence in high prevalence areas, the lack of sensitivity
5 of the screening test for detection of infected herds [single intradermal tuberculin (SIT)
6 test] can play a major role. Here, a scenario tree model mimicking the diagnostic test
7 scheme in place in the region of Castilla y Leon (Spain) was developed to estimate the
8 probability of detecting bTB in a newly infected officially tuberculosis free (OTF) herd
9 (herd sensitivity, HSe). In order to do so the probability of detecting at least one positive
10 animal in the SIT test with/without post-mortem (detection of lesions and culture)
11 confirmation in a recently infected herd was estimated using Monte Carlo simulation
12 through @RISK (Palisade Co, NY, USA). Uncertainty on the accuracy of the diagnostic
13 tests was introduced in the model using distributions based on the literature. The
14 performance of the model was evaluated by comparing the predicted number of
15 SIT/post-mortem positive animals in infected herds with those observed in newly
16 detected bTB-infected herds in the region in 2011-2015. The estimated HSe of the SIT
17 test was 76.2% (95% probability interval: 19.8-97.6). According to the model, bTB
18 infection would be then confirmed through culture in 65.3% (95% PI: 50.0 - 82.3) of the
19 herds detected through the SIT test, so that overall the proportion of newly bTB infected
20 herds in which the infection could be confirmed after the initial SIT test was 49.6%
21 (95% PI: 9.75 - 80.3. The predicted HSe of both SIT test and culture was directly
22 correlated with herd size. Results from the model suggest a moderate but highly
23 variable HSe of the current surveillance system in place for bTB detection in OTF herds
24 located in high prevalence areas, that could be maximized by performing multiple tests
25 within a year as indicated in the Spanish eradication program (with a median SIT HSe

26 of 87% when two consecutive tests were considered). In addition, these results highlight
27 the usefulness of performing subsequent SIT tests to rule out infection in SIT-positive
28 herds even when the causative agent cannot be isolated.
29
30 **Keywords:** Bovine tuberculosis, Cattle, Herd Sensitivity, Scenario Tree Modelling,
31 Diagnosis, Surveillance.

32 1. Introduction

33 Bovine tuberculosis is a cattle disease caused by members of the *Mycobacterium*
34 *tuberculosis* complex (MTC) (primarily *M. bovis* and, to a lesser extent, *M. caprae*) that
35 has a worldwide distribution (Collins, 2006; Michel et al., 2010). Due to its zoonotic
36 nature and the major economic losses it causes in the livestock sector, important efforts
37 are invested in its surveillance and control (OIE, 2011; Olea-Popelka et al., 2017;
38 WHO, 2017; Dean et al., 2018). These control strategies are typically based on the early
39 detection and removal of infected animals to prevent the spread of the disease, because
40 these animals can become infectious long before they exhibit clinical signs of bTB (de
41 la Rúa-Domenech et al., 2006). The implementation of control programs has led to a
42 significant decrease of bTB prevalence and its eventual eradication in many
43 industrialized countries (Cousins and Roberts, 2001; Collins, 2006), while success has
44 been more limited in others such as the UK or Ireland, (EFSA, 2016, 2017).
45 In Spain, a wide national bTB eradication program has been in place since 1993, and it
46 is nowadays based on the yearly skin testing of ≥ 6 weeks old animals and the parallel
47 use of the interferon-gamma (IFN- γ) assay as an ancillary diagnostic test in infected
48 herds, along with additional measures including slaughterhouse surveillance and control
49 in wildlife reservoirs (MAPA, 2017b). The success of this program has been limited due
50 in part to the fact that currently available diagnostic tests do not correctly determine the
51 MTC infection status in a proportion of the tested cattle (de la Rúa-Domenech et al.,
52 2006), so that the apparent prevalence (i.e., proportion of test-positive animals) may
53 differ from the true prevalence (proportion of infected animals). This could lead to the
54 misclassification of bTB-infected herds as officially tuberculosis free (OTF) due to the
55 absence of reactors particularly when using a test with a limited sensitivity, such as the
56 skin test (Adams, 2001; Pollock et al., 2005; de la Rúa-Domenech et al., 2006), as the

57 screening technique. In order to minimize this risk, the European legislation requires the
58 routine periodic testing of all animals in OTF herds from infected countries/regions
59 using the skin test; when infection is confirmed two consecutive skin tests in which no
60 reactors are detected (the first no less than 60 days after the removal of the last positive
61 reactor, and the second no less than four months and no more than 12 months after their
62 removal), must be conducted in a herd in order to recover its OTF status (annex A of
63 Council Directive 64/432/EEC). This strategy aims at compensating the lack of
64 individual sensitivity through the repeated testing of all the population at risk in order to
65 ensure an adequate herd sensitivity (de la Rúa-Domenech et al., 2006). However, this
66 herd sensitivity is difficult to estimate due to the many factors that may affect it, such as
67 the sensitivity and specificity of the individual test being used, the prevalence of the
68 disease and the number of animals in the herd being tested. In this context, scenario tree
69 modelling can be a useful tool (Alba et al., 2010; Norstrom et al., 2014; Foddai et al.,
70 2016; Isoda et al., 2017).

71 A scenario tree disaggregates a complex problem into its different components, in a
72 logical and temporal sequence, to ease its comprehension and the decision-making
73 under conditions of uncertainty (Weinstein, 1980). A branching structure (tree) is used
74 to represent every possible event in a specific setting, including uncertainties and the
75 associated outcomes; these uncertainties (probabilities) determine the transition along
76 the alternative branches (Rokach, 2015).

77 We present here an assessment of the sensitivity of the bTB eradication program for the
78 detection of bTB-infected cattle herds in the region of Castilla y Leon, which has the
79 largest cattle population in Spain [16,975 herds and 1,204,920 cattle in 2015 (MAPA,
80 2017b)], using scenario tree modelling. In order to achieve this aim, we first developed
81 a scenario tree mimicking the diagnostic test scheme established in the region for OTF

82 herds. The performance of our model was then evaluated by comparing the predicted
83 number of skin test reactors and post-mortem positive animals in infected herds with
84 those observed in bTB-infected herds detected in Castilla y Leon in 2011-2015. Once
85 the model was validated, we used it to estimate the expected herd sensitivity and,
86 consequently, the burden of disease that may remain undetected using the current bTB
87 diagnostic approach in this high prevalence region of Spain

88

89 **2. Materials and methods**

90 *2.1. The implementation of the Spanish bTB eradication program in Castilla y Leon:*
91 *diagnostic strategies and classification of herds according to bTB results*

92 The testing strategy performed in OTF cattle herds in Castilla y Leon is illustrated in
93 Figure 1. Briefly, the single intradermal tuberculin (SIT) test is used as the routine
94 technique following European and Spanish legislation (EU Council Directive
95 64/432/CEE and Royal Decree RD 2611/1996). The SIT test is performed by trained
96 veterinarians on >6 weeks old cattle in the herd (MAPA, 2017b) (Figure 1, a). To
97 maintain the officially tuberculosis free (OTF) status, a herd must undergo one or two
98 annual herd-tests (depending on the bTB prevalence in the local veterinary unit) with
99 negative results (MAPA, 2017b). If a reactor is found, the OTF status of the herd is
100 suspended and, if the presence of bTB is confirmed (through isolation of the causative
101 agent and/or epidemiological evidence) the OTF status is withdrawn, and the IFN- γ
102 release assay is then applied in the next herd-test in parallel to a new SIT test (Figure 1,
103 b). A herd recovers its OTF status or the suspension is lifted if no positive animals are
104 found in two consecutive herd tests.
105 Therefore, herds may be in any of the following mutually exclusive bTB statuses
106 (Figure 1):

107 *T3*: OTF herds;
108 *TS*: *T3* herds whose sanitary status has been suspended according to Real
109 Decreto 1716/2000 (reactors detected, pending of bacteriological confirmation);
110 *TR*: herds whose sanitary grade has been withdrawn according to Real Decreto
111 1716/2000 (reactors confirmed by bacteriology and/or epidemiological
112 evidences);
113 *T2*: herds whose bTB history in the last years is known, and that is undergoing
114 routine testing to achieve or regain or lift the suspension of the OTF status.
115 These are divided in two subcategories:
116 I. *T2*⁻: herds with no reactors in the last herd-test;
117 II. *T2*⁺: herds in which at least one reactor was disclosed in the last herd-
118 test or in which not every animal was tested;
119 *T1*: new herds or herds whose bTB history in the last years is unknown.
120 *2.2. Study data*
121 The bTB diagnostic tests results from all herd tests carried out during 2011-2015 in
122 cattle herds located in the region of Castilla y Leon, in the west-central area of Spain,
123 were screened for the identification of OTF herds whose OTF status was withdrawn
124 (*TR*). The ID, production type and size of every herd, as well as the dates in which the
125 tests were performed and the number of positive animals in the SIT test and post-
126 mortem analyses were stored in an Excel spreadsheet.
127 *2.3. Diagnostic tests*
128 2.3.1. Single cervical intradermal tuberculin test (SIT): The SIT test is performed
129 according to European and Spanish regulations (RD2611/1996, transposition of annex
130 A of Council Directive 64/432/EEC) by field practitioners on all >6 week-old animals
131 in the herd by intradermal inoculation of 0.1 ml of the official bovine PPD (CZ

132 Veterinaria, Porriño, Spain) in the anterior neck area. After 72 hours, animals with a >2
133 mm increase of the skin fold thickness (or with presence of clinical signs) are
134 considered reactors (extra-severe interpretation).

135 2.3.2. Post-mortem analyses: Reactors are culled at the slaughterhouse within the first
136 two weeks after being disclosed. They are subjected to a post-mortem examination for
137 detection of bTB compatible lesions and tissue samples (bTB lesions and, if these are
138 absent, lymph nodes from at least four of the following anatomic regions: head, thoracic
139 cavity, scapular region, abdominal cavity and mammary gland) are collected for
140 performing microbiological culture. Samples are stored at -20°C until their analysis.
141 Microbiological culture is performed as described elsewhere (Alvarez et al., 2014).

142 2.4. Scenario tree: description and applicability

143 Here, we formulated a scenario tree (Martin et al., 2007) representing the diagnostic
144 scheme applied in OTF cattle herds in the region of Castilla y Leon (Figure 1) to
145 estimate the Herd-Level Detection Sensitivity (HSe) based on probabilistic sampling.
146 The HSe is defined as the probability of finding at least one reactor in a diagnostic test
147 applied in a population of known size that is truly infected at a given prevalence (Martin
148 et al., 1992; Christensen and Gardner, 2000; Martin et al., 2007). A cohort of animals
149 belonging to a theoretical OTF herd ($T3$; Figure 1, a) of a certain size and subjected to
150 routine SIT testing that became infected at a certain (true) prevalence was considered
151 the starting point.

152 2.4.1. Simulating diagnostic tests in a newly bTB infected herd

153 When the theoretical bTB-infected herd is subjected to a routine SIT testing, the number
154 of SIT reactors (N_R) that would be expected is the sum of the true positive (i.e., infected
155 and positive in the SIT test, TP) and false positive reactors (not infected but positive in

156 the SIT test, FP). Both TP and FP are assumed to follow a Binomial distribution as
 157 follows:
 158 $TP \sim \text{Bn}(N_i, Se_{SIT} * Prev)$ and
 159 $FP \sim \text{Bn}(N_i, (1 - Sp_{SIT}) * (1 - Prev))$;
 160 where N_i is the herd size of the simulated herd, Se_{SIT} and Sp_{SIT} represent the sensitivity
 161 and specificity of the SIT test, respectively, and $Prev$ is the true bTB prevalence in the
 162 herd.
 163 If one or more reactors are found in the herd test, the OTF status of the herd is
 164 suspended and reactors culled and subjected to post-mortem analysis (detection of gross
 165 lesions at the slaughterhouse and bacteriological analysis). The number of slaughtered
 166 reactors with bTB lesions (N_{Les}) is assumed to follow a binomial distribution:
 167 $N_{Les} \sim \text{Bn}(TP, Se_{SL})$;
 168 where Se_{SL} is the probability that a bTB-infected/SIT-positive animal has visible lesions
 169 detectable in the slaughterhouse (slaughterhouse sensitivity; Table 1). The number of
 170 truly infected animals that are slaughtered but have no lesions (N_{noLes}) is the result of
 171 subtracting the N_{Les} from the TP .
 172 Finally, the number of culled bTB-infected animals in which the infection is confirmed
 173 by bacteriology (N_{Cult+}) is estimated assuming a different probability of detection (i.e.,
 174 sensitivity of the culture test) in animals with and without lesions, because a higher
 175 sensitivity of the technique was assumed for the former category (Araújo et al., 2014;
 176 Courcou et al., 2014). Therefore, N_{Cult+} is the sum of the number of lesion-
 177 positive/culture positive (N_{Cult+_NLes}) and of lesion-negative/culture positive animals
 178 (N_{Cult+_NoLes}), that are estimated separately using binomial distributions, so that:
 179 $N_{Cult+_NLes} \sim \text{Bn}(N_{Les}, Se_{CultureA})$ and
 180 $N_{Cult+_NoLes} \sim \text{Bn}(N_{noLes}, Se_{CultureB})$;

181 where $Se_{CultureA}$ and $Se_{CultureB}$ are the sensitivity of culture when performed in samples
 182 with lesions and without lesions, respectively.

183 The scenario tree was developed using the Decision Tree tool (Palisade Co, NY, USA).

184 2.4.2. Model assumptions

185 The sensitivities and specificities of the diagnostic tests applied (SIT test,
 186 slaughterhouse surveillance and bacteriology) were assumed to follow Beta
 187 distributions based on the scientific literature (Table 1). Briefly, for the SIT test, Se_{SIT}
 188 and Sp_{SIT} were modeled as Beta distributions based on previous studies performed in the
 189 same region (Alvarez et al., 2012) (Table 1). The sensitivity of the slaughterhouse
 190 surveillance was assumed to follow a Beta distribution centered on 55% as previously
 191 reported (Willeberg et al., 2018). For the sensitivity of bacteriology ($Se_{Culture}$), a most
 192 likely value of 78.1% with a 95% confidence that the true value was above 50% was
 193 assumed for animals with lesions (Courcoul et al., 2014), while in the case of animals
 194 without lesions this value was divided in half (Table 1). Culture was assumed to have a
 195 perfect specificity (Cousins, 2014).

196 2.4.3. Estimating the initial true within-herd prevalence in newly bTB infected herds

197 Values for the initial (true) bTB prevalence ($Prev$) were estimated using data from the
 198 SIT positive TR herds detected in Castilla y Leon in 2011-2015. First, the true
 199 prevalence in herd i ($Prev_i$) when the infection was first detected was estimated using
 200 the Rogan-Gladden estimation (Rogan and Gladen, 1978) as follows (equation 1):

$$201 \quad Prev_i = \frac{AP_i + (Sp_{SIT} - 1)}{Sp + (Se_{SIT} - 1)} \quad (1)$$

202 where Se_{SIT} and Sp_{SIT} represent the sensitivity and the specificity of the SIT test,
 203 assumed to follow a Beta distribution as explained before (Table 1), and AP_i the
 204 apparent prevalence (observed prevalence of reactors in the SIT test) in each of the i TR

205 herds. One thousand $Prev_i$ estimates per TR herd were obtained through Monte-Carlo
 206 iterations implemented using @RISK 7.5 (Palisade Co, NY, USA).
 207 A Beta distribution was then fitted to the median $Prev_i$ values obtained from all TR
 208 herds after the exclusion of herds with sizes <20 animals (in order to avoid artificially
 209 high $Prev_i$ estimates due to small sample sizes) and herds in which negative/zero
 210 median $Prev_i$ estimates were obtained. The Beta distribution was fitted using the
 211 `fitdistrplus` (Delignette-Muller, 2015) package in R, version 3.4 (RCoreTeam, 2017).
 212 2.4.4. Assessing the reliability of the conceptual model:
 213 In order to evaluate if the conceptual model adequately predicted the values observed in
 214 the field, the model was run for the breakdown herds detected in 2011-2015, defined as
 215 those in which infection was confirmed through culture and/or a positive median $Prev_i$
 216 estimate was obtained using the Rogan-Gladden formula. For each of the herds, infected
 217 with an initial bTB prevalence $Prev$ selected at random from the Beta distribution
 218 described in the previous section, one thousand iterations were run in @RISK, and the
 219 values for N_R , N_{Les} , N_{noLes} and N_{Cult+} and N_{Cult-} stored. These values (1000/herd) were
 220 then compared with the observed number of reactors and culture-positive animals found
 221 in each of the breakdown herds. When the observed value for N_R or N_{Cult+} of a given
 222 herd fell within the 5th and 95th percentile of the distribution of the simulated values, this
 223 was considered proof of an adequate predictive ability.
 224 2.4.5. Estimating the herd-level sensitivity of the SIT test (HSe_{SIT}), of the post-mortem
 225 analysis (HSe_{Cult}) and of the diagnostic strategy (HSe_{All})
 226 The HSe_{SIT} is the probability that at least one reactor in the SIT test is found in a truly
 227 infected herd. The HSe_{Cult} is the probability that at least one culled animal from a truly
 228 infected herd that had been detected in the SIT test is culture positive. Finally, HSe_{All} is
 229 the probability of finding at least one culture positive animal in a truly infected herd.

230 HSe_{SIT} and HSe_{All} were calculated as the proportion of iterations in which each infected
 231 herd was detected by the SIT test (i.e., $N_R > 0$) and by the post-mortem analysis (i.e.,
 232 $N_{Cult+} > 0$), respectively. HSe_{Cult} was calculated as the proportion of iterations with $N_R > 0$
 233 in which N_{Cult+} was > 0 (so that $HSe_{Cult} = HSe_{All}/HSe_{SIT}$).
 234 The resulting HSe_{SIT} , HSe_{Cult} and HSe_{All} estimated for each herd were used to fit Beta
 235 distributions using the `fitdistrplus` package in R.

236 2.4.6. Estimating the number of newly bTB-infected and misclassified herds in 2011- 237 2015 in Castilla y Leon

238 First, the apparent bTB herd prevalence ($herd_AP$) in each year j of the period 2011-
 239 2015 was calculated as the proportion of TR herds detected using SIT and culture out of
 240 all the OTF herds tested (equal to the total number of OTF herds reported by the official
 241 authorities of the region at the end of the previous year of study, $j-1$) (equation 2):

$$242 \quad herd_AP_j = \frac{TR_{(SIT + and Culture +)_j}}{OTF_{j-1}} \quad (2)$$

243 Dividing this proportion by the median of the HSe_{All} distribution, an estimate of the true
 244 herd prevalence of bTB ($herd_Prev$) for each year of study j was obtained as follows
 245 (equation 3):

$$246 \quad herd_Prev_j = \frac{herd_AP_j}{median\ HSe_{All}} \quad (3)$$

247 Then, each herd in the dataset from each year of study was randomly assigned an
 248 infection status (0, 1) using a Bernoulli distribution with a probability equal to the
 249 $herd_Prev_j$ for year j . For all the infected herds (infection status=1) the probability of
 250 detection using the SIT test (Figure 1, 1a) and of confirmation through culture for the
 251 SIT-positive herds (Figure 1, 1b) was estimated by drawing 1,000 values from a
 252 Bernoulli distribution with p equal to HSe_{SIT} and HSe_{Cult} , respectively.

253 In addition, and since bTB infected/SIT-positive herds in which infection is not
254 confirmed through culture still need to undergo two consecutive negative SIT tests to
255 recover the OTF status (Figure 1, dashed path: 2a and 3a), the probability of having no
256 reactors in SIT-positive/culture negative herds in two consecutive herd tests was
257 calculated based on a Bernoulli probability with $p = (1 - HS_{e_{SIT}})^2$.
258 Estimates were obtained through one thousand Monte-Carlo iterations implemented
259 using @RISK.

260

261 3. Results

262 A total of 1,930 *TR* herds were identified during 2011-2015 in Castilla y Leon through
263 routine SIT testing, slaughterhouse surveillance or epidemiological links with other
264 infected herds. The number of OTF herds tested and *TR* herds disclosed each year is
265 presented in Supplementary Table 1.

266 Among the 1,930 *TR* herds, 1,509 had at least one reactor. Of these, negative or zero
267 *Prev* estimates were obtained using the Rogan-Gladden formula for 111 *TR* herds, and
268 114 herds had <20 animals. Therefore, the *Prev*_{*i*} estimates from the remaining 1,284 *TR*
269 herds were used to fit the *Prev* Beta distribution, which had a median value of 2.64%
270 (95% PI: 0.05 - 15.54).

271 The model was then applied to the 1,475 breakdown herds detected in 2011-2015 [1,509
272 *TR* herds with at least one reactor except those in which infection was not confirmed
273 and yielded negative or zero *Prev* estimates (n=72) plus 38 *TR* herds identified through
274 slaughterhouse surveillance]. Most of them (86.6%) were beef herds, while 7.8%, 4.6%
275 and 0.9% were dairy, mixed and bullfighting herds, respectively. The median herd size
276 was 72 animals (interquartile range: 41-118). The number of SIT reactors detected
277 ranged from 0 (in the 38 herds detected through slaughterhouse surveillance) to 39

278 (median=1, IQR=1-2). The number of culture-positive animals found per herd ranged
 279 between 0 and 33 (median=0, IQR=0-1).

280 The number of both observed and predicted N_R and N_{Cult+} was directly correlated with
 281 the herd size (Figure 2). The observed number of SIT reactors N_R and culture positive
 282 animals N_{Cult+} was within the central 95% of the distribution of the simulated values in
 283 98.0% (1,446/1,475) and 98.2% (1,449/1,475) of the breakdown herds, respectively.

284 Out of the 29 herds whose N_R were not adequately predicted, the model overestimated
 285 the number of reactors in two and underestimated it in 27. Twenty of the
 286 “underestimated” herds were beef herds and 13 had less than 22 animals, while the
 287 remaining “underestimated” herds were distributed along the different herd size
 288 categories. In contrast, the two “overestimated” herds had > 187 animals. In the case of
 289 the N_{Cult+} , all the 26 miss-predicted herds were due to an underestimation of the
 290 observed number of culture positive animals. Twenty of them were beef herds, and
 291 fifteen had less than 22 animals. In ten of them, the model had also underestimated the
 292 expected number of reactors in the SIT test.

293 The probability of detecting an infected herd through the SIT test, HSe_{SIT} , ranged
 294 between 19.8% and 97.6%, with a median estimate of 76.2%. Larger herds yielded
 295 higher HSe_{SIT} estimates, with median values ranging between 47.6% and 92.2% for herd
 296 sizes lower than 42 animals and larger than 118 animals, respectively, and a larger
 297 uncertainty in estimates for small herds (Figure 3). No significant differences between
 298 the HSe_{SIT} values estimated depending on the production type were observed, although
 299 the estimates for bullfighting herds were more dispersed (Supplementary Figure 1).

300 The median probability of confirming the infection by culture in herds detected through
 301 the SIT test, HSe_{Cult} was 65.3% (95% PI: 50.0 - 82.3). The HSe_{Cult} was also correlated
 302 with the herd size, although these differences were less pronounced than in the case of

303 HSe_{SIT} , with median estimates of 56.4% and 74.8% for herds with sizes <42 and >118
304 animals (Figure 3). No differences were observed depending on the production type
305 (Supplementary Figure 1).

306 The median estimated probability of detecting the bTB infection in a herd through SIT
307 test and culture, HSe_{All} , was 49.6% (95% PI: 9.75 - 80.3). The HSe_{All} was directly
308 correlated to the number of animals in the herd too, with median estimates of 26.7% and
309 69.0% for herds with sizes <42 and >118 animals (Figure 3). Again, no differences were
310 observed depending on the production type other than the higher dispersion in the
311 bullfighting estimates (Supplementary Figure 1).

312 The observed $herd_{AP_j}$ values for the study period ranged between 0.55% and 0.72%
313 (Supplementary Table 1). Using the median HSe_{All} , these yielded $herd_{Prev_j}$ estimates
314 ranging between 1.16 and 1.51% (Supplementary Table 1). Figure 4 presents the
315 estimated probabilities of detection/misclassification of newly bTB-infected herds in
316 2013 as an example (yearly estimates differed by less than 0.3%). The median
317 probability of a newly infected herd passing two consecutive SIT test was 12.7% (95%
318 PI=11.6-14.0). If the newly infected herd was detected in the initial SIT test but not
319 confirmed through bacteriology, the probability that it would recover the OTF status
320 after testing negative in two consecutive SIT herd tests was 2.1% (1.5-2.8%).

321

322 4. Discussion

323 Even though the implementation of bTB national programs in developed countries has
324 led to very low herd prevalence of disease [a decrease from 11.4% in 1986 to <2% in
325 2005 in Spain (MAPA, 2017a)], its complete eradication has remained elusive in
326 several countries including Spain (with herd-prevalence values ranging between 1.31%
327 and 2.87 in 2006-2016). Among the most cited factors contributing to this lack of

328 success of the bTB eradication programs, the limited sensitivity of the diagnostic tests at
329 the individual level remains one of the main issues (de la Rúa-Domenech et al., 2006).
330 However, and given that the herd is the epidemiological unit of concern in the case of
331 control and eradication of bTB, the basis of the ongoing eradication programs is the
332 early detection of bTB infected herds in order to avoid further spread of the disease, and
333 therefore the herd-level sensitivity is of critical importance to ensure the progress of the
334 programs. The detection of bTB-infected herds in Spain is based on slaughterhouse
335 surveillance and the routine analysis of cattle >6 weeks using the SIT test. While the
336 sensitivity of the slaughterhouse surveillance has been recently estimated in a Spanish
337 region (Garcia-Saenz et al., 2015) and the reliability at the individual level of the bTB
338 diagnostic tests used in Spain has been evaluated using different approaches (Gonzalez
339 Llamazares et al., 1999; Aranaz et al., 2006; Alvarez et al., 2012; Alvarez et al., 2014),
340 there is limited information on the sensitivity of the current diagnostic approach at the
341 herd level. Here, we developed a scenario tree mimicking the diagnostic test scheme
342 applied in OTF herds in an attempt to evaluate its performance for detection of bTB
343 infection, given that bTB infected herds misclassified as OTF can further spread the
344 infection and are therefore of paramount importance in the epidemiology of the disease.
345 The herd sensitivity of any diagnostic test is a function of its individual sensitivity and
346 specificity, the number of individuals being tested and the within-herd prevalence
347 (Martin et al., 1992; Christensen and Gardner, 2000; Martin et al., 2007). While
348 multiple estimates of the sensitivity and specificity of the SIT test are available in the
349 literature (Alvarez et al., 2012; Nunez-Garcia et al., 2017; Pucken et al., 2017) and the
350 number of animals being tested in the case of bTB is equal to the herd size (except
351 animals <6 weeks), the true within-herd prevalence in bTB infected herds is typically
352 unknown. Using the observed number of reactors and prior distributions previously

353 used in the same population (cattle in Castilla y Leon) to model the Se_{SIT} and Sp_{SIT} , we
354 obtained a median within-herd bTB prevalence in recently infected herds of 2.64% with
355 a large variance (so that the 95% probability interval ranged between 0.05% and 15.54
356 %). This result is in agreement with the true within-herd prevalence estimated in a
357 previous study carried out in Irish cattle where a similar bTB eradication program is in
358 place (Willeberg et al., 2018).

359 The estimated herd sensitivity of the SIT test across herd sizes and production types was
360 moderate (median=76.2%, 95% PI: 19.8-97.6) suggesting that approximately three out
361 of four new bTB-infected herds would be picked up by the SIT test. When interpreting
362 this value, the specific characteristics of the study population evaluated here must be
363 considered: these were OTF herds in a high prevalence area that had been therefore
364 subjected to another SIT test in the previous 6-12 months in which no reactors had been
365 detected. Therefore, either the infection burden was very low in that previous SIT test,
366 or they were infected in the period elapsed between SIT tests. Either way it is likely that
367 the infection in most cases was present at very low prevalences when it was detected, as
368 suggested by the low number of reactors in most of the herds (median=1) and, as
369 mentioned before, the low estimated true within-herd prevalences (median=2.64%). In
370 this point most (if not all) infected animals would be expected to be in the early stages
371 of infection, when the sensitivity of the SIT test is most limited (Monaghan et al., 1994;
372 Pollock et al., 2005; Alvarez et al., 2012), thus explaining also the imperfect herd-level
373 sensitivity. Nevertheless, our results suggest that nearly 29% of the newly infected
374 herds could remain undetected in a first herd test, highlighting the importance of
375 frequent testing in OTF herds in high prevalence settings, since this percentage would
376 drop to 12.7% even assuming that the within-herd prevalence is not increasing between
377 SIT tests (Figure 4). Therefore, under the current circumstances conducting frequent

378 (i.e. every 6-12 months) SIT tests in herds in risk areas (such as the one under study,
379 with herd prevalences up to 3.71% in certain local veterinary units) is warranted to
380 prevent further spread of the disease.

381 Our model suggested that among the bTB-infected herds detected through the SIT test
382 the infection would be confirmed in approximately two out of three herds on average
383 (median=65.3%, 95% PI=50.0 - 82.3). These results highlights the importance of
384 limiting animal movements originating from herds in which SIT-positive animals are
385 detected even when MTC cannot be isolated from the reactors until further evidence of
386 the lack of infection (i.e., additional negative SIT results) is obtained, as mandated in
387 the European legislation [Articles 6(1) and 14(1) of Council Directive 78/52/EEC]. This
388 relatively low proportion of confirmation in SIT-positive herds would be explained by
389 the limited sensitivity of the culture method compared with immunology-based
390 methods, as already reported (Corner, 1994; Monaghan et al., 1994; Goodchild and
391 Clifton-Hadley, 2001; Pollock and Neill, 2002; Vordermeier et al., 2004), particularly in
392 recently infected animals in which lesions are not developed by the time of infection, as
393 typically observed in reactors culled in low prevalence settings (Byrne, 1992; Tweddle
394 and Livingstone, 1994; Goodchild and Clifton-Hadley, 2001; Anon, 2005; de la Rua-
395 Domenech et al., 2006). Moreover, even when present, the sensitivity of slaughterhouse
396 surveillance for detection of bTB-compatible lesions is nevertheless limited (Garcia-
397 Saenz et al., 2015; Pascual-Linaza et al., 2017; Willeberg et al., 2018).

398 The moderate herd sensitivity of the SIT test and the limited individual sensitivity of the
399 post-mortem tests explain that altogether the probability of confirming the presence of a
400 bTB infection through the detection of SIT reactors and the posterior isolation of MTC
401 from them in the initial herd test ($HS_{e_{All}}$) was relatively low (median=49.6%, 95% PI:
402 9.75% - 80.3%). Nevertheless, bTB-infected/SIT-positive/culture-negative herds would

403 still not be considered OTF until two additional herd tests in which no reactors are
404 found are carried out, what would be very unlikely according to our model (8.7% of the
405 infected herds initially detected by SIT in which no positive cultures are obtained,
406 Figure 4).

407 The herd-level sensitivity of the SIT test and post-mortem methods was highly
408 correlated with the herd size (Fig 3). This is not surprising since at a certain assumed
409 within-herd prevalence the higher the herd size the higher the expected number of
410 infected animals/positive animals (Fig 2). Our results agree with previous studies that
411 have identified herd size as a factor associated with bTB detection (Skuce et al., 2012;
412 Smith et al., 2014). On the other hand, no differences depending on the production type
413 were observed, even though the reliability of diagnostic tests may be different in beef
414 vs. dairy vs. bullfighting herds (Rodríguez-Prieto et al., 2012; Alvarez et al., 2014).
415 Nevertheless, our study population was mostly composed of beef herds (>86 %), and
416 therefore this may have limited our ability to detect difference in test performance
417 depending on production type.

418 Overall, and based only in the performance of the active surveillance efforts, we
419 estimated that between 28% and 30.7% of the new bTB infected herds may be missed in
420 the first SIT test conducted after becoming infected (Table 2). Although a large
421 proportion of these herds would be detected in subsequent SIT herd-tests, this highlights
422 the importance of passive surveillance conducted in routinely slaughtered animals from
423 OTF herds to enhance the overall confidence in disease freedom in T3 herds.

424 Our model adequately predicted the observed number of SIT reactors and culture
425 positive animals in ~98% of the bTB breakdown herds detected in Castilla y Leon in
426 2011-2015, respectively. Still, the predictive performance was more limited in small
427 herds (<22 animals) in which, as expected, a change in a single animal represents a

428 difference of 5% in the within-herd prevalence, and the model tended to underestimate
429 the proportion of positive animals to either technique. In contrast, larger herds in which
430 predictions consistently underestimate the observed number of reactors/infected animals
431 could be indicative of diagnostic problems and/or more advanced infections.
432 In conclusion, our results suggest that the actual diagnostic scheme of bTB based on
433 SIT screening would be able to detect approximately three out of four newly infected
434 herds at a low within-herd prevalence in the first herd-test (of which two thirds would
435 be confirmed by the post-mortem analysis), and around nine out of ten within the first
436 two herd tests. Since the probability of misclassifying an infected herd decreases after
437 consecutive herd tests, this highlights the importance of routine testing of OTF herds
438 and, in the case of positive herds, even when MTC was not isolated, the usefulness of
439 undergoing two consecutive herd tests with SIT negative results to recover or lift the
440 suspension its OTF status in high prevalence areas.

441

442 **Declarations of interest**

443 None

444

445 **Acknowledgements**

446 Pilar Pozo is the recipient of a pre-doctoral grant of the National Program for the
447 Promotion of Talent and Its Employability of the Spanish Ministry of Economy,
448 Industry and Competitiveness (MINECO) (DI-15-08098). Javier Bezos is recipient of a
449 Juan de la Cierva Incorporación Research contract (IJCI-2015-24805) funded by
450 the MINECO. JA is recipient of a Ramón y Cajal postdoctoral contract from the
451 Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) (RYC-2016-

- 452 20422). This work was supported by the Programa de Tecnologías Avanzadas en
453 Vigilancia Sanitaria (TAVS) from the Comunidad de Madrid (ref. S2013/ABI-2747).

454 **References**

- 455 Adams, L.G., 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection.
456 *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 20, 304-324.
- 457 Alba, A., Casal, J., Napp, S., Martin, P.A.J., 2010. Assessment of different surveillance
458 systems for avian influenza in commercial poultry in Catalonia (North-Eastern
459 Spain). *Preventive veterinary medicine* 97, 107-118.
- 460 Alvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marques, S., Grau, A., Saez, J.L., Minguez, O., de
461 Juan, L., Dominguez, L., 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of
462 bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a
463 Bayesian approach. *Veterinary microbiology* 155, 38-43.
- 464 Alvarez, J., Perez, A., Marques, S., Bezos, J., Grau, A., de la Cruz, M.L., Romero, B.,
465 Saez, J.L., del Rosario Esquivel, M., Martinez Mdel, C., Minguez, O., de Juan,
466 L., Dominguez, L., 2014. Risk factors associated with negative in-vivo
467 diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Vet Res*
468 10, 14.
- 469 Anon, 2005. Annual Report for the Year Ending 30 June 2005. Animal Health Board,
470 Wellington.
- 471 Aranz, A., De Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L.,
472 López-Sánchez, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006. Assessment of diagnostic
473 tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with
474 *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary*
475 *research* 37, 593-606.
- 476 Araújo, C.P., Osório, A.L.A.R., Jorge, K.S.G., Ramos, C.A.N., Souza Filho, A.F.,
477 Vidal, C.E.S., Vargas, A.P.C., Roxo, E., Rocha, A.S., Suffys, P.N., Fonseca,
478 A.A., Silva, M.R., Barbosa Neto, J.D., Cerqueira, V.D., Araújo, F.R., 2014.
479 Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline
480 tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 633-640.
- 481 Byrne, D., 1992. Analysis of post-mortem data on tuberculin reactor cattle. *Irish*
482 *Veterinary Journal*. 45, 131-132.
- 483 Collins, J.D., 2006. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Veterinary*
484 *microbiology* 112, 369-381.
- 485 Corner, L.A., 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle.
486 *Veterinary microbiology* 40, 53-63.
- 487 Courcoul, A., Moyer, J.L., Brugere, L., Faye, S., Henault, S., Gares, H., Boschirolí,
488 M.L., 2014. Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology,
489 histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis
490 using latent class analysis. *PloS one* 9, e90334.
- 491 Cousins, D.V., 2014. Bovine tuberculosis. . *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines*
492 *for Terrestrial Animals*. Paris: World Organisation for Animal Health, 1-16.
- 493 Cousins, D.V., Roberts, J.L., 2001. Australia's campaign to eradicate bovine
494 tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis (Edinburgh,*
495 *Scotland)* 81, 5-15.
- 496 Christensen, J., Gardner, I.A., 2000. Herd-level interpretation of test results for
497 epidemiologic studies of animal diseases. *Preventive veterinary medicine* 45, 83-
498 106.
- 499 de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G.,
500 Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of
501 tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay

- 502 and other ancillary diagnostic techniques. *Research in veterinary science* 81,
503 190-210.
- 504 Dean, A.S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A.E., Glaziou, P., Benyahia, A.,
505 Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Gifford, G., Lubroth, J., Raviglione, M.,
506 Fujiwara, P., 2018. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach
507 to ending tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases* 18, 137-138.
- 508 Delignette-Muller, M.L., Dutang, C., 2015. fitdistrplus: An R Package for Fitting
509 Distributions. *Journal of Statistical Software* 64, 1-34.
- 510 EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,
511 zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016 14,
512 4634.
- 513 EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,
514 zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017 15,
515 5077.
- 516 Foddai, A., Stockmarr, A., Boklund, A., 2016. Evaluation of temporal surveillance
517 system sensitivity and freedom from bovine viral diarrhoea in Danish dairy herds
518 using scenario tree modelling. *BMC Vet Res* 12, 118.
- 519 Garcia-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J., Allepuz, A., 2015. Estimation of the
520 individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in
521 Catalonia (North-Eastern Spain). *Preventive veterinary medicine* 121, 332-337.
- 522 Gonzalez Llamazares, O.R., Gutierrez Martin, C.B., Alvarez Nistal, D., de la Puente
523 Redondo, V.A., Dominguez Rodriguez, L., Rodriguez Ferri, E.F., 1999. Field
524 evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-
525 gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain.
526 *Veterinary microbiology* 70, 55-66.
- 527 Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S., 2001. Cattle-to-cattle transmission of
528 *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 23-41.
- 529 Isoda, N., Asano, A., Ichijo, M., Wakamori, S., Ohno, H., Sato, K., Okamoto, H.,
530 Nakao, S., Kato, H., Saito, K., Ito, N., Usui, A., Takayama, H., Sakoda, Y.,
531 2017. Evaluation of control measures for bovine viral diarrhoea implemented in
532 Nemuro District, Hokkaido, Japan, using a scenario tree model. *The Journal of*
533 *Veterinary Medical Science* 79, 1172-1181.
- 534 MAPA, 2017a. Informe Final Técnico, Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina,
535 Año 2016. SANTE/2016/ES/SI2.725989.
- 536 MAPA, 2017b. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de
537 Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2017.
- 538 Martin, P.A., Cameron, A.R., Greiner, M., 2007. Demonstrating freedom from disease
539 using multiple complex data sources 1: a new methodology based on scenario
540 trees. *Preventive veterinary medicine* 79, 71-97.
- 541 Martin, S.W., Shoukri, M., Thorburn, M.A., 1992. Evaluating the health status of herds
542 based on tests applied to individuals. *Preventive veterinary medicine* 14, 33-43.
- 543 Michel, A.L., Müller, B., van Helden, P.D., 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-
544 human interface: A problem, or not? *Veterinary microbiology* 140, 371-381.
- 545 Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The
546 tuberculin test. *Veterinary microbiology* 40, 111-124.
- 547 Norstrom, M., Jonsson, M.E., Akerstedt, J., Whist, A.C., Kristoffersen, A.B., Sviland,
548 S., Hopp, P., Wahlstrom, H., 2014. Estimation of the probability of freedom
549 from bovine virus diarrhoea virus in Norway using scenario tree modelling.
550 *Preventive veterinary medicine* 116, 37-46.

- 551 Nunez-Garcia, J., Downs, S.H., Parry, J.E., Abernethy, D.A., Broughan, J.M., Cameron,
552 A.R., Cook, A.J., de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.V., Gunn, J., More,
553 S.J., Rhodes, S., Rolfe, S., Sharp, M., Upton, P.A., Vordermeier, H.M., Watson,
554 E., Welsh, M., Whelan, A.O., Woolliams, J.A., Clifton-Hadley, R.S., Greiner,
555 M., 2017. Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and
556 post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland.
557 Preventive veterinary medicine.
- 558 OIE, 2011. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter
559 2.4.7. Bovine Tuberculosis.
- 560 Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A.S., Mumford, E., Erlacher-Vindel,
561 E., Forcella, S., Silk, B.J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O.,
562 LoBue, P., Fujiwara, P.I., 2017. Zoonotic tuberculosis in human beings caused
563 by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *The Lancet. Infectious diseases* 17,
564 e21-e25.
- 565 Pascual-Linaza, A.V., Gordon, A.W., Stringer, L.A., Menzies, F.D., 2017. Efficiency of
566 slaughterhouse surveillance for the detection of bovine tuberculosis in cattle in
567 Northern Ireland. *Epidemiology and Infection* 145, 995-1005.
- 568 Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in
569 Cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115-127.
- 570 Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine
571 tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease.
572 *Veterinary immunology and immunopathology* 108, 37-43.
- 573 Pucken, V.B., Knubben-Schweizer, G., Dopfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A.,
574 Hormansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Zimmermann, P.,
575 Hartnack, S., 2017. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the
576 southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS one* 12, e0179847.
- 577 RCoreTeam, 2017. R: A language and environment for statistical computing. . R
578 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [https://www.R-](https://www.R-project.org/)
579 [project.org/](https://www.R-project.org/).
- 580 Rodriguez-Prieto, V., Martinez-López, B., Barasona, J.Á., Acevedo, P., Romero, B.,
581 Rodriguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaino, J.M., Vicente, J., 2012.
582 A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in
583 domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC Veterinary Research*
584 8, 148-148.
- 585 Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening
586 test. *American journal of epidemiology* 107, 71-76.
- 587 Rokach, L., Maimon, O., 2015. *Data Mining with Decision Trees: Theory and*
588 *Applications*. 2nd edition. Series in Machine Perception and Artificial
589 Intelligence. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 81.
- 590 Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W.J., 2012. Herd-Level Risk Factors for Bovine
591 Tuberculosis: A Literature Review. *Veterinary Medicine International* 2012,
592 621210.
- 593 Smith, R.L., Tauer, L.W., Sanderson, M.W., Grohn, Y.T., 2014. Minimum cost to
594 control bovine tuberculosis in cow-calf herds. *Preventive veterinary medicine*
595 115, 18-28.
- 596 Tweddle, N.E., Livingstone, P., 1994. Bovine tuberculosis control and eradication
597 programs in Australia and New Zealand. *Veterinary microbiology* 40, 23-39.
- 598 Vordermeier, M., Goodchild, A., Clifton-Hadley, R., de la Rua, R., 2004. The
599 interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *The*
600 *Veterinary record* 155, 37-38.

- 601 Weinstein, M.C., Fineberg, H.V., Elstein, A.S., Frazier, H.S., Neuhauser, D., Neutra,
602 R.R., McNeil, B.J., 1980. *Clinical Decision Analysis*. WB. Saunders,
603 Philadelphia., 351.
- 604 WHO, F., OIE, 2017. *Roadmap for Zoonotic Tuberculosis*.
- 605 Willeberg, P.W., McAloon, C.G., Houtsma, E., Higgins, I., Clegg, T.A., More, S.J.,
606 2018. The Herd-Level Sensitivity of Abattoir Surveillance for Bovine
607 Tuberculosis: Simulating the Effects of Current and Potentially Modified Meat
608 Inspection Procedures in Irish Cattle. *Frontiers in veterinary science* 5, 82.

609 Table 1. Parameters and formulas introduced in the scenario tree.

PARAMETER	DESCRIPTION	VALUES	REFERENCE	DISTRIBUTION
Se_{SIT}	Sensitivity of SIT test	Mode: 69.4%, 5 th percentile: 40.1%	Alvarez et al., 2012	Beta (5.5645, 2.6323)
Sp_{SIT}	Specificity of SIT test	Mode: 99.4%, 5 th percentile: 98.7%	Alvarez et al., 2012	Beta (556.8986, 3.6870)
P_{prev}	True Prevalence		SIT positive <i>TSTR</i> herds, Castilla y Leon, 2011-2015	Beta (0.9086, 23.5487)
TP	SIT True Positives (n)			Binomial ($N_i, Se_{SIT} * P_{prev}$)
FP	SIT False Positives (n)			Binomial ($N_i, (1 - Sp_{SIT}) * (1 - P_{prev})$)
TN	SIT True Negatives (n)	$N_i * TP + FP + FN$		
FN	SIT False Negatives (n)	$Bin(N_i, (1 - Se_{SIT}) * P_{prev})$		
N_g	SIT reactors (n)			Binomial ($N_i, (1 - Se_{SIT}) * P_{prev}$)
Se_{SIT}^a	Slaughterhouse Sensitivity for SIT reactors	Mode: 55%, 5 th percentile: 9.5%	Willeberg et al., 2018	Beta (1.3403, 1.1493)
N_{Les}	SIT reactors with detected lesions			Binomial (TP, Se_{SIT})
N_{NoLes}	SIT reactors without detected lesions			
$Se_{CultureA}$	Culture Sensitivity in samples from lesions	Mode: 78.1%, 5 th percentile: 50%	Courcoul et al., 2014 Expert opinion	Beta (6.4723, 2.0434)
$Se_{CultureB}$	Culture Sensitivity in samples from no lesions	Mode: 39.05%, 5 th percentile: 10%	Expert opinion (half of $Se_{CultureA}$)	Beta (2.0183, 2.9751)
$Sp_{Culture}$	Culture Specificity	100%	Cousins, 2014	
$N_{Cult+Les}$	Culture positives with detected lesions (n)			Binomial ($N_{Les}, Se_{CultureA}$)
$N_{Cult+NoLes}$	Culture positives without detected lesions (n)			Binomial ($N_{NoLes}, Se_{CultureB}$)
N_{Cult+}	Total Culture positives (n)			
N_i	Sample size breakdown herds, 2011-2015	IQR: 41-118	Breakdown herds, Castilla y Leon, 2011-2015	

610 ^a P1-P2-P3: P1: probability that a SIT reactor arrived at the slaughterhouse presenting Macroscopically Detectable Lesions (MDL); P2: probability that MDL were detected by routine meat inspection process; P3:

611 probability that the veterinary officer suspected BTB and sent the sample for laboratory confirmation

612 ^b Sensitivity analysis

613 Figure 1. Testing plan and classification of herds according to bTB results in the region
614 of Castilla y Leon.

615

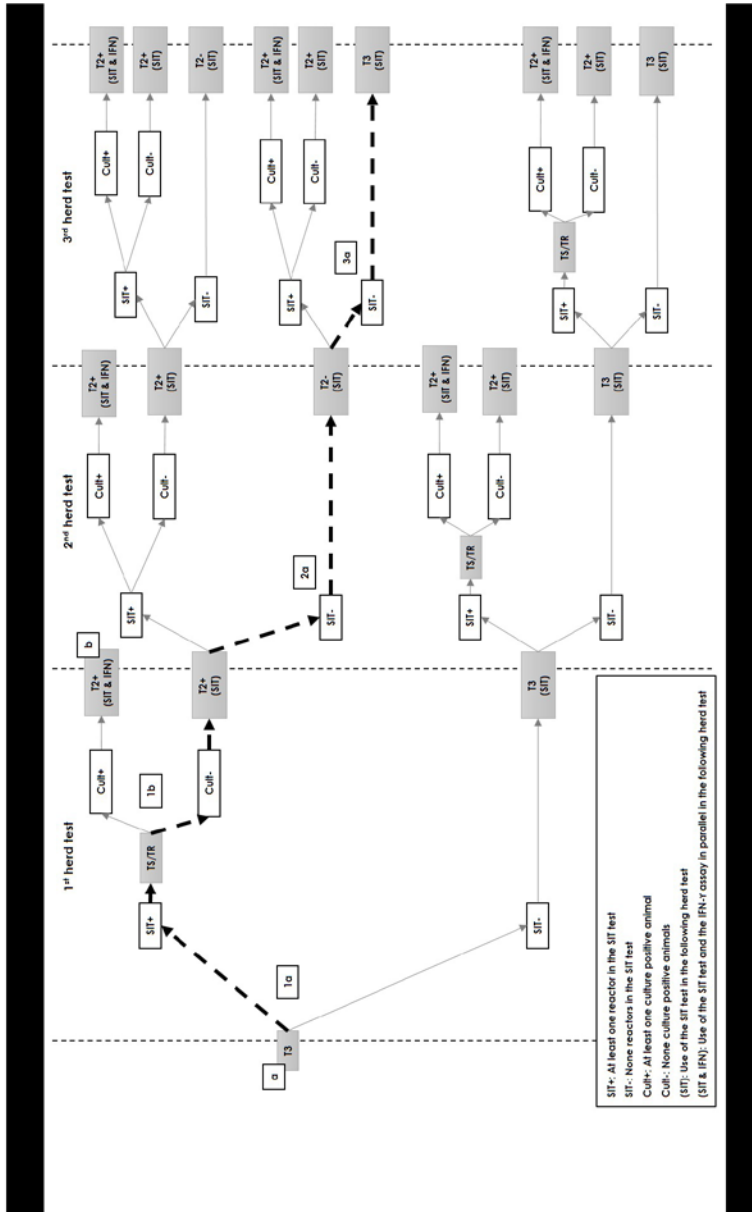
616 Figure 2. Comparison of predicted (95% probability interval) vs observed (number of
617 animals: points) N_R (top) and N_{Cult+} (bottom) in breakdown herds detected in Castilla y
618 Leon in 2011-2015 by herd size category.

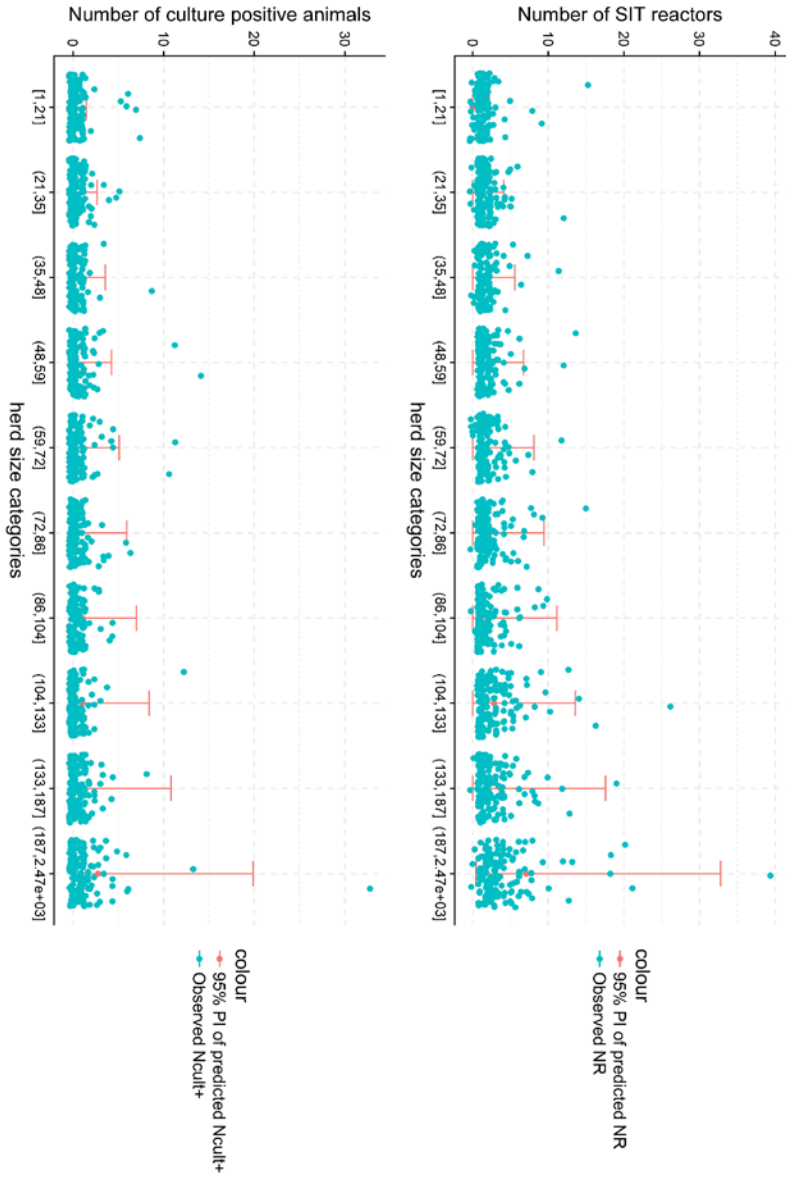
619

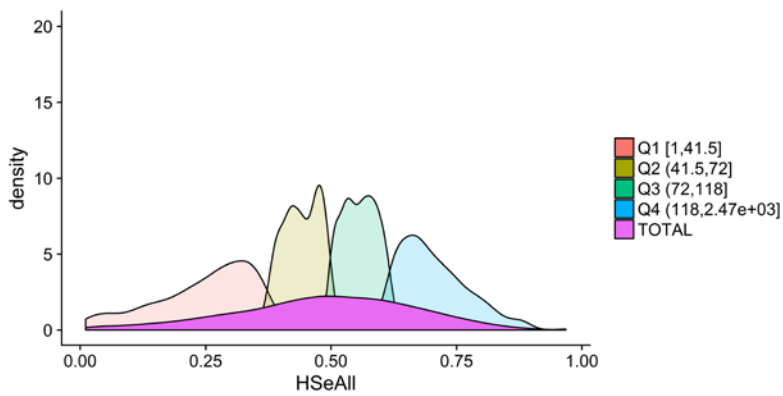
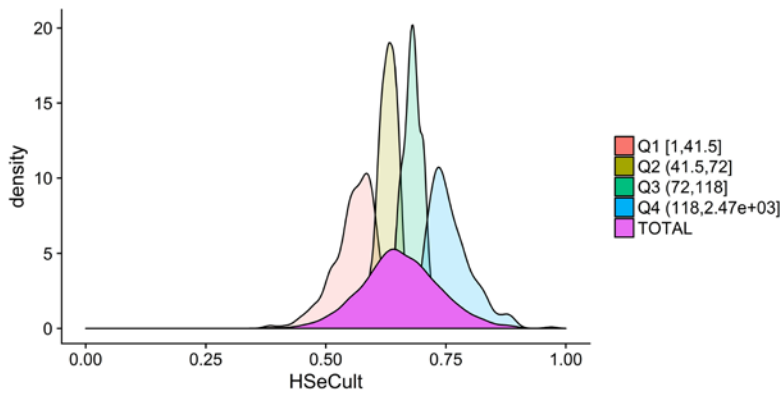
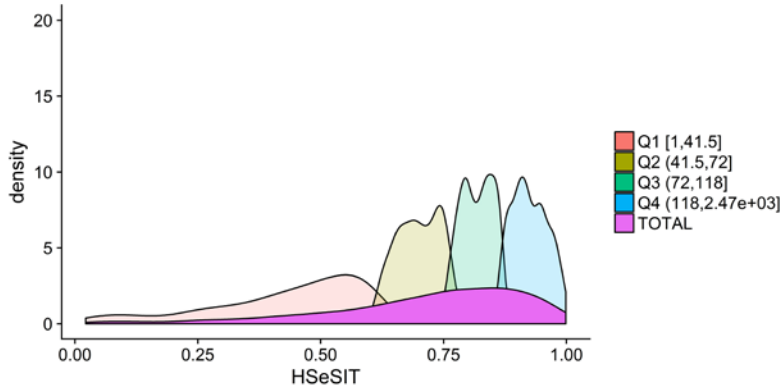
620 Figure 3. Estimated HSe_{SRT} (top), HSe_{Cult} (middle) and HSe_{All} (bottom) by herd size
621 category.

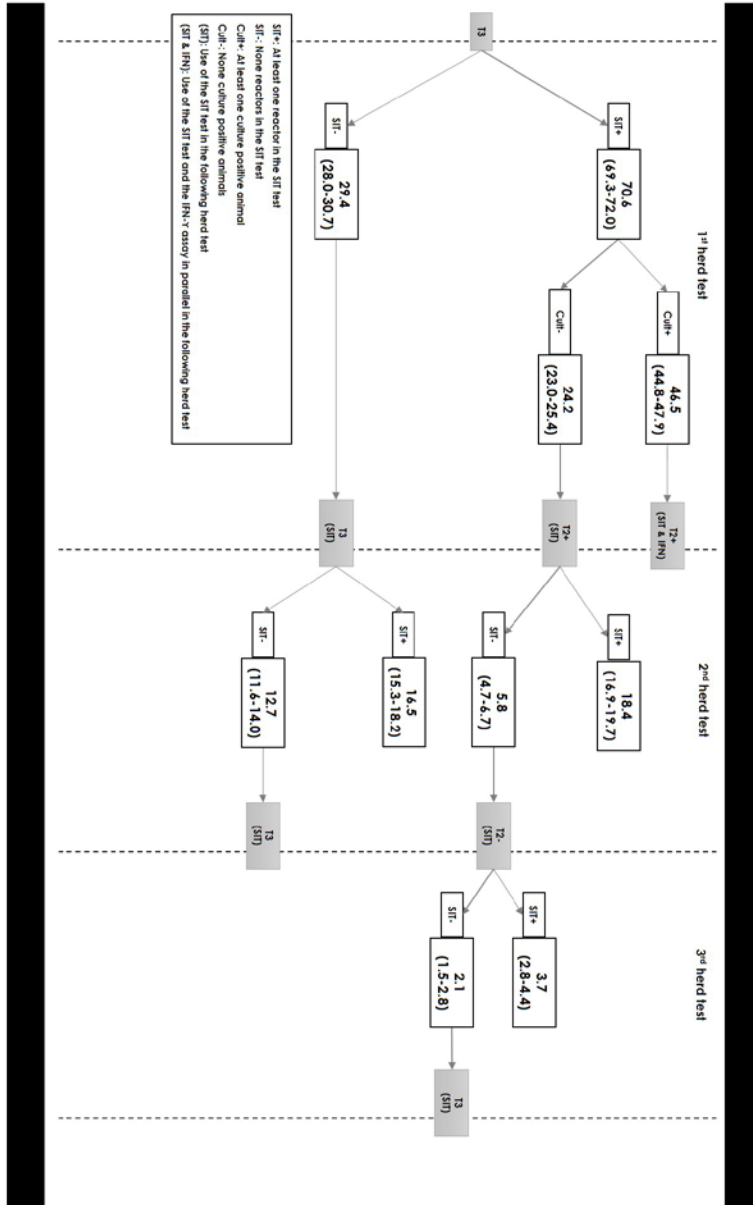
622

623 Figure 4. Estimated median (and 95% PI) probability of detection/misclassification of
624 infected herds for the year 2013.

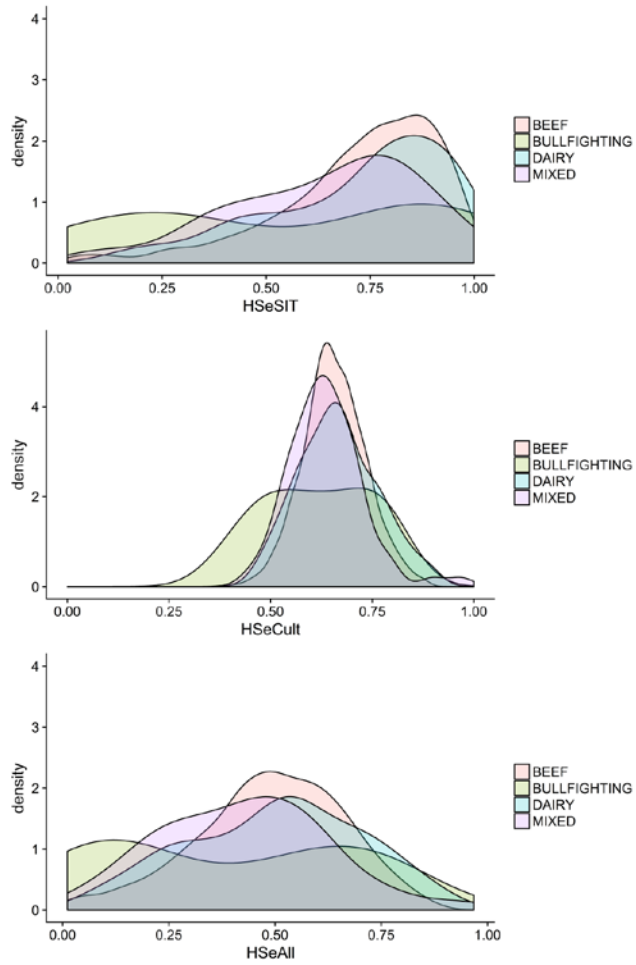








Supplementary Figure 1. Estimated HSe_{SIT} (top), HSe_{Cult} (middle) and HSe_{All} (bottom) by production type.



Supplementary Table 1. Number of OTF herds tested and TR herds disclosed, the apparent bTB herd prevalence (*herd_AP*) and the estimated true herd prevalence of bTB (*herd_Prev*) for each year of study.

Year	2011	2012	2013	2014	2015
Number of OTF herds tested	13,470	13,183	11,031	13,311	14,077
Number of SIT+/Culture- TR herds	138	110	248	313	285
Number of SIT+/Culture+ TR herds	97	73	73	85	87
Number of SIT-/Culture+ TR herds	11	22	2	1	2
Number of SIT-/Culture- TR herds	124	104	30	61	64
<i>herd_AP</i>	0.72%	0.59%	0.66%	0.64%	0.62%
<i>herd_Prev</i>	1.51	1.16	1.39	1.34	1.30
Median estimated number of bTB infected herds	203	152	153	178	182

6.3.2. La vacunación como estrategia de control de la infección por *Salmonella* en porcino: Revisión sistemática y meta-análisis de la literatura científica

La carne de cerdo es una de las más consumidas a nivel mundial y también una de las principales fuentes de salmonelosis de origen alimentario. La infección por *Salmonella* en cerdos es generalmente endémica y está caracterizada por una sintomatología leve a moderada (con la excepción de *S. Choleraesuis*). Cerdos asintomáticos pueden llegar a matadero y, por tanto, contaminar la cadena alimentaria. Es por ello que el control a nivel de granja es tan importante y la vacunación es una estrategia adecuada para alcanzar dicho fin. A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo para evaluar el impacto de la vacunación en el control de la infección por *Salmonella* en cerdos, los resultados son altamente variables, debido en parte a la heterogeneidad de vacunas y protocolos de vacunación existentes. Por tanto, en el trabajo aquí presente se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura científica con el fin de actualizar el conocimiento existente sobre los serotipos y metodologías empleadas en la vacunación, así como un meta-análisis de los valores cuantitativos de la efectividad de las vacunas para evaluar el efecto de estos factores en los resultados.

La búsqueda de los trabajos de interés se llevó a cabo en dos repertorios online y la revisión, tanto del resumen como del texto por completo de los artículos identificados, se llevó a cabo por dos revisores en paralelo. Los valores extraídos de efectividad se combinaron en el meta-análisis empleando el método del inverso de variancia y se utilizaron modelos de efectos fijos o aleatorios en función de la variabilidad observada dentro de los ensayos y entre ellos. La presencia de sesgo de publicación se evaluó mediante el gráfico de árbol de navidad y la prueba estadística de Macaskill.

Se identificó un total de 126 artículos que describían el uso de vacunas frente a *Salmonella* en ganado porcino, de los cuales 44 cumplían los criterios de inclusión y fueron de los que se extrajo la información de interés. La mayoría de los estudios (36/44) emplearon vacunas atenuadas y los serotipos *S.*

Typhimurium y *S. Choleraesuis* fueron los principalmente evaluados. Como medida de la efectividad de la vacuna para el meta-análisis se eligió el porcentaje de animales cuyas muestras de heces o de tejidos fueron positivas a cultivo porque, además de ser la medida más frecuentemente reportada en los ensayos revisados, un resultado positivo a cultivo refleja el estado agudo de infección. Las estimaciones globales obtenidas en este trabajo confirman la efectividad significativa de la vacunación, aunque moderada. La estimación correspondiente a las vacunas atenuadas (reducción del porcentaje de animales positivos a cultivo del 26,8%; intervalo de confianza del 95%: 19,71-33,8) fue similar a la obtenida en vacunas inactivadas (29,5%; 14,5-44,4). No se observó un efecto del serotipo sobre la efectividad de las vacunas atenuadas; sin embargo, se observó una mayor efectividad de las vacunas inactivadas frente a *S. Choleraesuis*, aunque en un número muy reducido de ensayos.

Los resultados de este trabajo pueden ayudar al diseño de programas que minimicen el riesgo de transmisión de determinados serotipos a través de la cadena alimentaria.



Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature



M.L. de la Cruz^a, I. Conrado^b, A. Nault^c, A. Perez^b, L. Dominguez^a, J. Alvarez^{b,*}

^a Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Avenida de Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, 1971 Commonwealth Ave, St Paul, MN 55108, USA

^c Veterinary Medical Library, University of Minnesota, 1971 Commonwealth Ave, St Paul, MN 55108, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2017

Received in revised form 8 March 2017

Accepted 10 March 2017

Available online xxxxx

Keywords:

Systematic review

Meta-analysis

Salmonella

Pig

Vaccination

ABSTRACT

Consumption or handling of improperly processed or cooked pork is considered one of the top sources for foodborne salmonellosis, a common cause of intestinal disease worldwide. Asymptomatic carrier pigs may contaminate pork at slaughtering; therefore, pre-harvest reduction of *Salmonella* load can contribute to reduce public health risk. Multiple studies have evaluated the impact of vaccination on controlling *Salmonella* in swine farms, but results are highly variable due to the heterogeneity in vaccines and vaccination protocols. Here, we report the results of an inclusive systematic review and a meta-analysis of the peer-reviewed scientific literature to provide updated knowledge on the potential effectiveness of *Salmonella* vaccination. A total of 126 articles describing the use of *Salmonella* vaccines in swine were identified, of which 44 fulfilled the inclusion criteria. Most of the studies (36/44) used live vaccines, and *S. Typhimurium* and *S. Choleraesuis* were the predominant serotypes evaluated. Vaccine efficacy was most often measured through bacteriological isolation, and pooled estimates of vaccine efficacy were obtained as the difference in the percentage of positive animals when available. Attenuated and inactivated vaccines had similar efficacy [Risk Difference = −26.8% (−33.8, −19.7) and −29.5% (−41.4, −14.5), respectively]. No serotype effect was observed on the efficacy recorded for attenuated vaccines; however, a higher efficacy of inactivated vaccines against *S. Choleraesuis* was observed, though in a reduced sample. Results from the meta-analysis here demonstrate the impact that vaccination may have on the control of *Salmonella* in swine farms and could help in the design of programs to minimize the risk of transmission of certain serotypes through the food chain.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	87
2. Materials and methods	87
2.1. Systematic review and data extraction	87
2.2. Meta-analysis	88
3. Results	88
3.1. Meta-analysis	90
4. Discussion	92
5. Conclusions	93
Conflict of interest statement	93
Acknowledgements	93
Appendix A. Supplementary data	93
References	93

* Corresponding author at: Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 1365 Gortner Avenue, St. Paul, MN 55108, USA. E-mail address: jalvarez@umn.edu (J. Alvarez).

1. Introduction

Pork is one of the most frequently consumed meat in the world¹ and, for that reason, there is a need for mitigating risk arising from its consumption for public health. Modern production systems have contributed to the production of safer pork meat and pork products compared to traditional practices, reducing the risk of transmission of many zoonotic pathogens such as *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii* or *Taenia solium*. Nevertheless, pork meat and pork products may still serve as source of infection for other foodborne pathogens, including *Salmonella enterica* (Davies, 2011). *Salmonella*, one of the most prevalent foodborne pathogens worldwide, poses a multifaceted threat to food production and food safety, further complicated by the emergence of antimicrobial-resistant strains. According to the latest EFSA/ECDC report on zoonoses and zoonotic agents, pork and associated products were responsible for 9.3% of 225 foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Europe (European Food Safety and ECDC, 2015). Likewise, in the US, a “farm-to-fork” model was used to estimate that about 100,000 cases of human salmonellosis annually were associated with pork (Miller et al., 2005).

Salmonella infections in pig herds are often endemic and are usually characterized by mild-to-moderate, and often absent, clinical symptoms, with the notable exception of those caused by *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Choleraesuis (S. Choleraesuis) (Baloda et al., 2001; Gray and Fedorka-Cray, 2001; Gray et al., 1995; Imberechts et al., 1998; Meldrum, 1993). The presence of asymptomatic carrier pigs is a concern given that, in addition to creating a reservoir of *Salmonella* for other pigs in the herd (Boyen et al., 2008), they may reach the slaughterhouse, thereby potentially contaminating the food chain (Boyen et al., 2008; Merilidi et al., 2008). Although *Salmonella* infection/contamination may occur at all production stages, its pre-harvest elimination is strategically important because it would reduce the bacteria load at the origin (Rostagno, 2011).

Vaccination, defined as any intervention designed to stimulate an immune response to protect against infection, may be a viable approach to control *Salmonella* infection in pig herds through an increase of resistance to the bacteria in susceptible pigs (Boyen et al., 2008; Haesebrouck et al., 2004). Induction of long-lasting immunity against *Salmonella* infection relies upon the development of T- and B-cell-specific immunity (Mastroeni et al., 2001). Killed *Salmonella* whole-cell vaccines have been used in animals with variable results, probably due to their limited ability to induce cell-mediated immunity (Davies and Breslin, 2003; Xu et al., 1993). In contrast, attenuated live vaccine strains have been shown to offer relatively good protection against infection due to the induction of a strong cellular immune response and mucosal IgA production (Haesebrouck et al., 2004). Still, and although multiple studies have evaluated the impact of vaccination to control *Salmonella* infection in pigs, results are highly variable. This variability is due in part to the heterogeneity of the approaches tested so far in terms of antigenic diversity, dose, frequency and route of administration, and the age of the vaccinated animals among others (Wales and Davies, 2016), which complicates the assessment of the potential effectiveness of vaccination under field conditions.

Previous efforts to systematically summarize vaccine efficacy for control of *Salmonella* in swine, published in the peer-reviewed literature, included only papers published until 2011 (Denagamage et al., 2007; Wilhelm et al., 2012; Wisener et al., 2014; FAO/WHO, 2016). In addition, they were focused on studies assessing vaccine efficacy through fecal culture (Denagamage et al., 2007; Wisener et al., 2014) and included only studies published in English (Denagamage et al., 2007; Wisener et al., 2014) or English and French (Wilhelm et al., 2012) languages.

The objective of the study here was to update the knowledge on *Salmonella* vaccine efficacy through an inclusive systematic review of the existing literature in order to assess the range of strains and methodologies used for its application. Subsequently, a meta-analysis of quantitative values on vaccination efficacy was conducted when possible to evaluate the influence that several factors related with the vaccination strategy had in the results. Results will help to understand the role that vaccination may play in controlling *Salmonella* infection in swine farms and, ultimately, preventing or mitigating the impact of the disease on public health.

2. Materials and methods

2.1. Systematic review and data extraction

Literature searches were carried out in PubMed (MEDLINE²) and CAB Abstracts³ on March 1st 2015 to first identify studies describing a strategy to control or eradicate *Salmonella* at different stages (farm, lairage, and slaughterhouse) in the production chain that were written in English, Spanish or French. The final search strings used for each database were as follows:

- “Salmonella Infections, Animal/prevention and control”[Mesh] OR “Salmonella”[Mesh] AND “Swine”[Mesh] (PubMed)
- “(pigs and salmonella).od OR (pigs.od and salmonella infections.id)” (CAB Abstracts).

Records were imported into Refworks⁴ and duplicates were removed. A first screening of the records was performed by two of the co-authors (MLdC, IC) in parallel using a defined set of inclusion and exclusion criteria (Table 1). Abstracts were examined by both coauthors and a record was only removed from the database when there was mutual agreement that it did not fulfill the inclusion criteria (Table 1). In case of lack of agreement, a third author (JA) also reviewed the abstract and made a final decision.

The full-text of the remaining references were retrieved and reviewed in a second phase to classify the studies based on the control strategy described and to extract the relevant information. References cited in the retrieved publications were also reviewed to identify additional articles considered relevant, that underwent the same selection process described above. In order to standardize the data extraction process, an Excel spreadsheet was created and used by all researchers involved in data extraction (Supplementary data). Information on studies describing control strategies other than vaccination will be described in a separate manuscript. Extracted information of studies dealing with vaccination included the following variables: country and year when the study took place; type of study (challenge – when animals were infected experimentally to assess vaccine efficacy – or field – when vaccinated and control animals were followed under field conditions without experimental infection); age, breed and weight of animals; type (animal, batch, herd, etc.) and number of units of animals; type (inactivated/attenuated, serotype and commercial/experimental) and specific vaccine strain (if provided); dose and route of vaccination when applicable; sample type and diagnostic test used to evaluate presence of *Salmonella* after vaccination; and estimate of protective effect of vaccination (if provided) (Supplementary data). The flow of information through the systematic review process is shown in Fig. 1 (Moher et al., 2009).

Occasionally, the same study evaluated the efficacy of different vaccines or of a single vaccine at different doses, applied through different administration routes or with alternative adjuvants. When possible, information on each “trial” (defined as the measurement of the efficacy of

¹ See: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html (accessed September 2016)

² See: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

³ See: <http://www.cabi.org/publishing-products/>.

⁴ See: www.refworks.com/.

Table 1
Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion	Exclusion
Animals species being evaluated: must include (but not limited to) domestic pigs	Does not include actual or theoretical <i>Salmonella</i> infection/contamination on the domestic pig/pork
Field/experimental studies	Lab/bench studies
Study performed on farm, lairage or slaughterhouse	All other locations [laboratory]
Unit of study [animal, batch, herd]	Others [surfaces, food/water trough]
Control group present [group subjected to no vaccination (before the establishment of the intervention or parallel) or a different intervention; same challenge or field exposure to the pathogen]	Control group absent
Provides some measure of the efficacy of the strategy	Efficacy of the strategy not measured
Language: English, Spanish, French	Other languages

a combination of strain, dose, vaccine composition and route) was extracted so that a single reference could be divided into multiple trials. When the efficacy measure was measured more than once during the study, data collected at the end of the study were preferred.

2.2. Meta-analysis

The inverse-variance weighting method was used to combine the efficacy values coming from the trials identified in the systematic review (Delgado, 2010). Fixed or random effects models were used depending on the observed variability within and between trials, measured using Q s assay (Delgado, 2010). Due to the dependency of the reliability of this test on sample size, the Higgins statistic (I^2) (Higgins and Thompson, 2002) was also used. The I^2 ranges from 0 to 100% and represents the percentage of variation in the point estimate that can be attributed to between-trial heterogeneity rather than chance. The following guidelines have been suggested for its interpretation: unimportant (0–40%), moderate (30–60%), substantial (50–90%) and considerable (75–100%) (Deeks et al., 2008). An additional evaluation of the between-trial variability was carried out using the τ^2 (tau) statistic, which when negative indicates a lack of significance in between-trial variance (Delgado, 2010). The weight of each trial in a fixed-effects model is defined by the inverse of the variance of the parameter (synonymous to the variation within-trial); in the case of a random-effects model, the weight is the sum of the within-trial variation and the between-trial variation (τ^2).

The presence of publication bias was assessed visually using Christmas tree plots (Delgado, 2010) and, more formally, using the Macaskill test (Macaskill et al., 2001), in which a linear regression model is adjusted between the effect estimates and the sample size of the trials; a slope near or equal to zero and non-significant denotes the absence of publication bias in the meta-analysis.

All calculations were carried out using the Macro IMAR V2012.03.20© (Domenech, 2012) implemented in the SPSS software V.20 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

A total of 4375 unique articles were retrieved through the search strings run on Pubmed and CAB Abstracts. Of these, 2846 articles were excluded because the species under study was not the pig (415, 9.5%), the study was performed somewhere different from the farm, lairage or slaughterhouse (1443; 33.0%) or it was performed in-vitro (629, 14.4%), there was no control group (defined as a comparable group of animals subjected to the same exposure but that was not vaccinated) (43, 1.0%) or a combination of several of the reasons above (316, 7.2%) (See inclusion criteria, Table 1). In addition, the abstract of 565 (12.9%) studies was unavailable and could not be evaluated. The remaining 964 articles fulfilled the inclusion criteria, and their full-text was retrieved for further evaluation. One hundred and twenty-six of them (47 retrieved through PubMed and 79 through CAB Abstracts) evaluated the application of a vaccine. Of these, the full text of three

could not be accessed. Seventy-nine articles were discarded in this second stage since, although they passed the initial screening, they were either in-vitro studies (11, 13.9%), *Salmonella* was not the pathogen under study (7, 8.9%), were review articles that did not include original information (7, 8.9%) or were written in languages other than English, Spanish or French (54, 68.3%); therefore, a total of 44 articles (34.9% of the initial 126 articles) were ultimately included in this systematic review (Fig. 1, Table 2).

All 44 studies took place between 1978 and 2014 and were performed in 15 different countries (Supplementary Table 1). Thirteen of them (29.5%) were field studies (i.e., no experimental infection was carried out) and 31 (70.5%) were challenge studies. The animal sample size per study ranged between 12 and 7000 animals, and only few studies (8, 18.2%) specified the type of production system in which the vaccines were evaluated, that was predominantly farrow-to-finish (5/8). Seventeen studies (38.6%) were performed using suckling pigs, 18 (40.9%) in weaned pigs and seven (15.9%) in fattening pigs, while no information on the age was provided in two studies (4.5%). The breed of the pigs was specified in 13 articles (29.5%), with the majority (9/13, 69.2%) being mixed breed. Data on the weight of animals was only provided in three studies (6.8%).

A total of 73 trials that differed on the type and/or doses of vaccine, administration routes or use of alternative adjuvants as defined above were identified in the 44 articles. Characteristics of the trials are summarized in Table 3. Most of them were based on the use of live vaccines

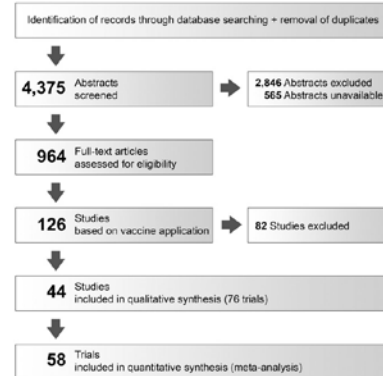


Fig. 1. Flow of information through the systematic review process.

Table 2
Studies that fulfilled the inclusion criteria.

Articles
Arguello, H., et al., 2013. Evaluation of protection conferred by a <i>Salmonella</i> Typhimurium inactivated vaccine in <i>Salmonella</i> -infected finishing pig farms. <i>Comp Immunol Microbiol Infect Dis</i> 36, 489–498.
Baum, D.E., et al., 1987. Use of SC54 for the reduction of <i>Salmonella</i> in swine. Proceedings of the 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of <i>Salmonella</i> in Pork (Copenhagen, Denmark) 215.
Bhattacharya, H.M., et al., 1978. A trial on swine paratyphoid vaccine. <i>Indian J Anim He</i> 17, 31–33.
Charles, S.D., et al., 2000. Reduced shedding and clinical signs of <i>Salmonella</i> Typhimurium in nursery pigs vaccinated with a <i>Salmonella</i> Choleraesuis vaccine. <i>Swine Health Prod</i> 8, 107–112.
Chu, C.Y., et al., 2007. Heterologous protection in pigs induced by a plasmid-cured and <i>crp</i> gene-deleted <i>Salmonella</i> choleraesuis live vaccine. <i>Vaccine</i> 25, 7031–7040.
Coe, N.E., et al., 1992. Alteration of neutrophil function in RCG treated and non-treated swine after exposure to <i>Salmonella</i> typhimurium. <i>Vet Immunol Immunop</i> 33, 37–50.
De Ridder, L., et al., 2014. Use of a live attenuated <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium vaccine on farrow-to-finish pig farms. <i>Vet J</i> 202, 303–308.
De Ridder, L., et al., 2013. Effect of a DNA vaccine with and without in-feed use of coated calcium-butyrate on transmission of <i>Salmonella</i> Typhimurium in pigs. <i>BMC Vet Res</i> 9, 1–8.
Dewes, H.F., 1979. Effects of vaccination with killed <i>Salmonella</i> bacteria. <i>New Zeal Vet J</i> 27, 106–107.
Draayer, J.A., 1986. Protecting weaning pigs against salmonellosis. <i>Vet Med Sm Anim Clin</i> 81, 776–777.
Farzan, A. and Friendship, R.M., 2010. A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling <i>Salmonella</i> infection and the association of <i>Salmonella</i> -shedding and weight gain in pigs. <i>Can J Vet Res</i> 74, 258–263.
Gibson, K.J., et al., 1999. Investigation into the capability of a <i>Salmonella</i> choleraesuis live vaccine to reduce the shedding of <i>Salmonella</i> typhimurium in swine. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of <i>Salmonella</i> in Pork, 302–304.
Gradassi, M., et al., 2013. Attenuated <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium lacking the <i>ZnuABC</i> transporter: an efficacious orally administered mucosal vaccine against salmonellosis in pigs. <i>Vaccine</i> 31, 3695–3701.
Groninga, K.J., et al., 2000. <i>Salmonella</i> delta by cross-protection study. <i>Vet Therapist</i> : 1, 59–62.
Han, Y., et al., 2014. Efficacy and safety of an oral somatostatin DNA vaccine without antibiotic resistance gene in promoting growth of piglets. <i>Scand J Immunol</i> 79, 244–250.
Hareidi, T., et al., 2011. Evaluation of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium and <i>Choleraesuis</i> slyA mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. <i>Comp Immunol Microbiol Infect Dis</i> 34, 396–403.
Hanra, J., et al., 1979a. Immunization of pregnant sows with a live <i>Salmonella</i> choleraesuis vaccine. <i>Vet Microbiol</i> 3, 303–309.
Hanra, J., et al., 1979b. Evaluation of a live <i>Salmonella</i> choleraesuis vaccine by intranasal challenge. <i>Res in Vet Sci</i> 26, 216–219.
Hayden, J., 2005. <i>Salmonella</i> control in pigs using a live attenuated <i>Salmonella</i> typhimurium vaccine (TAD <i>Salmonella</i> vacReg, T. Lohmann animal health). <i>Pig J</i> 55.
Hur, J. and Lee, J.H., 2010. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live <i>Salmonella</i> vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. <i>Vet Microbiol</i> 143, 270–276.
Hur, J., et al., 2011. Efficacy of a novel virulence gene-deleted <i>Salmonella</i> Typhimurium vaccine for protection against <i>Salmonella</i> infections in growing piglets. <i>Vet Immunol Immunop</i> 139, 250–256.
Keneedy, M.J., et al., 1969. Attenuation and immunogenicity of Delacaya Delacarp derivatives of <i>Salmonella</i> choleraesuis in pigs. <i>Infect Immun</i> 67, 4628–4636.
Kramer, T.T., et al., 1987. Conjunctival and intramuscular vaccination of pigs with a live avirulent strain of <i>Salmonella</i> choleraesuis. <i>Am J Vet Res</i> 48, 1072–1076.
Kramer, T.T., et al., 1992. Safety and efficacy of an attenuated strain of <i>Salmonella</i> choleraesuis for vaccination of swine. <i>Am J Vet Res</i> 53, 444–448.
Ku, Y.W., et al., 2005. Novel attenuated <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> strains as live vaccine candidates generated by signature-tagged mutagenesis. <i>Infect Immun</i> 73, 8194–8203.
Lee, H., et al., 2007. Protective effects of mix-oxide outer membrane protein <i>Salmonella</i> vaccine against salmonellosis in chickens and pigs. <i>Korean J Vet Res</i> .
Leffler, A., et al., 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of <i>Salmonella</i> in swine. <i>Can J Vet Res</i> 27, 31.
Leyman, B., et al., 2012. Vaccination of pigs reduces <i>Salmonella</i> Typhimurium numbers in a model mimicking pre-slaughter stress. <i>Vet J</i> 194, 250–252.
Lindner, T., et al., 2002. Immunoprophylaxis - a contribution to control <i>Salmonella</i> typhimurium-infection in pigs. <i>Tierärztliche Praxis</i> , 30, 392–394.
Lumsden, J.S. and Wilkie, B.N., 1992. Immune response of pigs to parenteral vaccination with an aromatic-dependent mutant of <i>Salmonella</i> typhimurium. <i>Can J Vet Res</i> 56, 286–302.
Lumsden, J.S., et al., 1991. Resistance to fecal shedding of salmonellae in pigs and chickens vaccinated with an aromatic dependent mutant of <i>Salmonella</i> typhimurium. <i>Am J Vet Res</i> 52, 1784–1787.
Maes, D., et al., 2001. Evaluation of cross-protection afforded by a <i>Salmonella</i> Choleraesuis vaccine against <i>Salmonella</i> infections in pigs under field conditions. <i>Ber Munch Tierarztl Wochenschr</i> 114, 339–341.
Nash, W.A., 2004. <i>Salmonella</i> control in poultry and pigs. <i>Pig J</i> 54, 146–156.
Ottmann, K., et al., 2004. Vaccination trials with a <i>Salmonella</i> typhimurium live vaccine for control of salmonella infections in breeding stock. <i>Prakt Tierarz</i> : 85, 273–280.
Pesciaroli, M., et al., 2013. <i>Salmonella</i> Typhimurium lacking the <i>ZnuABC</i> transporter is attenuated and immunogenic in pigs. <i>Vaccine</i> 31, 2868–2873.
Roesler, U., et al., 2006. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated <i>Salmonella</i> vaccine decreases the prevalence of <i>Salmonella</i> typhimurium infection in the offspring. <i>J Vet Med B</i> 53, 224–228.
Roesler, U., et al., 2004. Oral vaccination of pigs with an invasive <i>gyaA-cpaA-epoB</i> <i>Salmonella</i> Typhimurium mutant. <i>Vaccine</i> 23, 595–603.
Roof, M.L. and Dorchneroff, D.D., 1995. Safety, efficacy, and duration of immunity induced in swine by use of an avirulent live <i>Salmonella</i> choleraesuis-containing vaccine. <i>Am J Vet Res</i> 56, 39–44.
Ruggieri, J., et al., 2014. Parenteral administration of attenuated <i>Salmonella</i> Typhimurium DelaznaABC is protective against salmonellosis in piglets. <i>Vaccine</i> 32, 4032–4038.
Schwartz, P., et al., 2011. Use of an avirulent live <i>Salmonella</i> Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of <i>Salmonella</i> carrier pigs at slaughter. <i>Vet Rec</i> 169, 553.
Selke, M., et al., 2007. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium live negative marker vaccine. <i>Infect Immun</i> 75, 2476–2483.
Springer, S., et al., 2001. Investigation of the efficacy of a genetically-stable live <i>Salmonella</i> typhimurium vaccine for use in swine. <i>Ber Munch Tierarztl Wochenschr</i> 114, 342–345.
Szabel, H., et al., 1993. Oral immunization of mice and swine with an attenuated <i>Salmonella</i> choleraesuis [delta- <i>gja-12</i> delta- <i>crp-ol1</i>] mutant containing a recombinant plasmid. <i>Infect Immun</i> 61, 610–618.
Takada-Iwao, A., et al., 2013. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination reduces PCV2 and <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> confection model. <i>Vet Microbiol</i> 162, 219–223.

(76.7%), and though multiple routes were described, the oral one was the most frequent and comprised approximately one third of trials specifying this characteristic (25/67). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *S. Choleraesuis* were used in approximately half of the trials each (Table 3).

The control groups included in the reviewed trials were primarily groups subjected to no intervention (or a different intervention) but that received the same challenge or field exposure to the pathogen

and contained similar number of animals (n = 69, 94.5%). In the remaining 4 trials (5.5%), entirely carried out under field conditions, the control group was composed by the same animals prior to the intervention.

Efficacy of the vaccination strategy was evaluated by comparing the differences in the percentage of affected animals in the control and vaccinated groups (Supplementary figure). The most common approach to measure vaccine efficacy was bacteriological isolation (63/73, 86.3%)

Table 3
Characteristics of the trials based on vaccination for control of *Salmonella* in pigs selected in stage 2.

Characteristic (number of trials)	Category	
Vaccine (73 trials)	Live	76.7% (56)
	Inactivated	19.2% (14)
	Combination ^a	4.1% (3)
Commercial vs experimental	Commercial	28.6% (21)
	Experimental	71.2% (52)
Dose (73 trials)	Minimum	10 ⁶ CFU
	Median	10 ⁸ CFU
	Maximum	10 ¹⁰ CFU
Route (67 trials)	Oral	37.3% (25)
	Intramuscular	19.4% (13)
	Water/food	13.4% (9)
	Intranasal	7.5% (5)
	Subcutaneous	7.5% (5)
	Intragastric	3.0% (2)
	Conjunctival	3.0% (2)
Type of trial (73 trials)	Combination ^b	9.0% (6)
	Field	27.4% (20)
	Oral challenge	60.3% (44)
	Intranasal challenge	12.3% (9)
	S. Typhimurium	49.3% (36)
Serotype (73 trials)	S. Choleraesuis	42.5% (31)
	S. Derby ^c	1.4% (1)
	Combination ^d	6.8% (5)

^a Administration of inactivated and live vaccines to the same animal or to sows and piglets simultaneously.

^b Combination of the previous routes.

^c Simultaneous combination of S. Typhimurium and S. Choleraesuis or the former serotypes with others (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Agona, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis).

^d S. Derby, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Derby.

followed by mortality (4 trials, 5.5%) and histological evaluation of organs/tissues (3 trials, 4.1%), serology (2 trials, 2.7%) and the observation of clinical signs (diarrhea) (one trial, 1.4%). Bacteriology was performed on fecal (44 trials, 69.8%) or tissue samples collected at necropsies (19 trials, 30.2%) and quantitative results (log of CFU/g of sample) were provided in only nine trials (Supplementary figure).

3.1. Meta-analysis

Pooled data analysis was performed for the trials that compared the percentage of bacteriology-positive animals in vaccinated vs control groups or that included information that allowed its calculation (51/73 trials extracted from 30/44 references) because that was the only category providing an acceptable (>9 trials) sample size. The effect of vaccination on *Salmonella* colonization and excretion in the meta-analysis was thus recorded as a risk difference (RD) and for its calculation the *DerSimonian and Laird* method was applied (Delgado, 2010). Random effects models were preferred over fixed effect models due to the evidence of high heterogeneity between trials when a fixed effect model was used ($I^2 = 90.8\%$ when all trials were pooled).

Table 4

Pooled efficacy (difference in the percentage of *Salmonella* culture-positive samples) of vaccination stratified by vaccine type (live attenuated, inactivated vaccines and a combination of both live attenuated and inactivated vaccines).

Type of vaccine	N	Risk difference	Significance	95% CI ^a		I ² (95% CI)	
				Lower limit	Upper limit		
Live attenuated	Global	37	-26.7%	p < 0.001	-33.83	-19.71	29.4% (0.0–53.1)
	Serotype	S. Choleraesuis	21	-25.48%	p < 0.001	-33.31	-17.61
Inactivated	Global	14	-29.96%	p < 0.001	-40.24	-19.69	29.8% (1.6–62.9)
	Serotype	S. Choleraesuis	2	-73.81%	p < 0.001	-96.82	-50.93
Live attenuated + inactivated	Global	6	-24.41%	p = 0.002	-39.89	-8.92	41.4% (0.0–76.8)
	S. Typhimurium	3	-50.95%	p = 0.011	-90.15	-11.76	0.0%

^a 95% CI, 95% confidence interval.

Overall 29/51 (56.9%) trials reported that vaccination was significantly associated with a reduced frequency of isolation of *Salmonella* in pigs. A pooled estimate of the reduction in the risk of *Salmonella* colonization and/or excretion (detected through culture of feces or tissue) due to vaccination of 28.6% (95% confidence interval: 22.4–34.7) was found. Even though the between-trial heterogeneity was only moderate when using a random effects model (38.1%, 95% CI: 13.0–56.0), the analysis was further broken down in different vaccine types to account for the biologic heterogeneity present in the trials (different types of vaccines using different *Salmonella* serotypes).

Use of attenuated and inactivated vaccines provided similar estimates of efficacy (RD = 27–29%), whereas an increased efficacy was found when both types were combined (Table 4). Higher uncertainty around the point efficacy estimate were found for the inactivated vaccines and the combination of live and inactivated vaccines due to the more reduced sample size (n = 11 and 3 respectively) (Table 4).

When efficacy of vaccines was analyzed by serotype, similar values (RD = 25–30%) were observed for live attenuated vaccines regardless of the serotype (Table 4, Fig. 2). However, a much larger heterogeneity was observed among inactivated vaccines, with S. Choleraesuis vaccines conferring an apparently higher level of protection than those formulated with S. Typhimurium (that in turn yielded similar values than live attenuated vaccines) (Table 4, Fig. 2). However, generalizability of results is again limited due to reduced sample size (Table 4).

Slightly larger risk differences were also recorded when the trials were carried out under experimental (challenge) conditions. When applying live vaccines, a reduction of 27.5% (95% CI: 18.1 to 36.8) in the proportion of positive samples for *Salmonella* isolation was observed in trials involving an experimental challenge (n = 31) compared with 21.3 (95% CI: 10.8 to 31.9) under field conditions (n = 6). In the case of inactivated vaccines this difference became more evident, going from 36.3% (95% CI: 1.4 to 71.3; n = 6) in challenge studies to 23.9% (6.4 to 41.3; n = 5) under field conditions. In addition, the overall heterogeneity between estimates from field trials was higher than that observed among challenge trials ($I^2 = 46.5\%$ and $I^2 = 22.1\%$, respectively).

The effect of route of vaccination did not seem to have a major impact on the efficacy of the vaccine, with largely overlapping confidence intervals for estimates obtained using the predominant (intramuscular and oral) routes (Table 5). Comparison of the pooled efficacy of the route of vaccination by vaccine type was not possible since only one trial included the use of an inactivated vaccine administered orally.

A higher protective effect for experimental vaccines was found compared with commercial vaccines (37.5%, 95% CI: 26.34–45.15 versus 16.03%, 95% CI: 9.44–22.63, respectively). In addition, a much larger variability in the efficacy reported in trials using commercial vaccines was found even if a random-effects model was used ($I^2 = 54.98\%$, 95% CI: 23.44–73.53) compared with experimental vaccines ($I^2 = 6.96\%$, 95% CI: 0.0–37.4), indicating a large heterogeneity in the results obtained for the former class.

A large proportion of the trials included in the meta-analysis had limited sample sizes, as evidenced in the Christmas tree plot (Fig. 3). Although a more limited effect was observed in the studies with larger

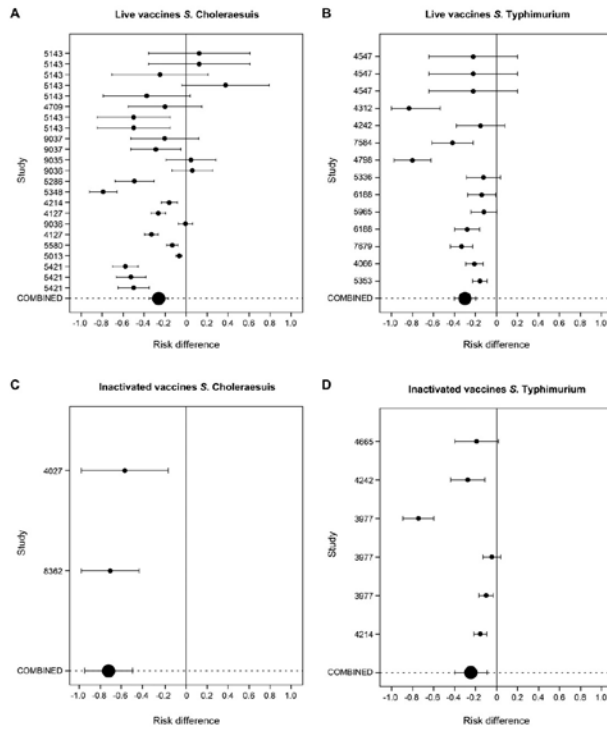


Fig. 2. Comparison of the effect of the different vaccines distinguishing the target *Salmonella* serotype.

sample sizes (Fig. 3), the result of the Macaskill test suggested no evidences indicative of publication bias were present ($p = 0.136$).

A total of 23 trials expressed the effect of the vaccine administration using an approach different from the difference in the percentage of bacteriology-positive animals and are summarized in Supplementary

Table 2. Among those, pooled estimates of efficacy were calculated for those reporting a difference in the percentage of deaths ($n = 4$), resulting in a 55.3% (95% CI: 31.5 to 79.1) reduction in deaths in the vaccinated groups when a live attenuated vaccine was administered compared with 4.2% (3.2 to 5.2) with an inactivated vaccine

Table 5
Pooled efficacy (difference in the percentage of *Salmonella* culture-positive samples) of vaccination stratified by route of administration.

Route of administration	Type of vaccine	N	Risk difference	Significance	95% CI ^a		I ² (95% CI)
					Lower limit	Upper limit	
Intramuscular	Live attenuated	5	-27.36%	$p = 0.016$	-49.56	-5.15	0.0% (0.0-65.9)
	Inactivated	5	-15.71%	$p = 0.117$	-35.34	-3.91	68.6% (19.3-87.8)
Oral	Live attenuated	21	-22.97%	$p < 0.001$	-31.41	-14.53	43.9% (6.1-66.5)

^a 95% CI 95% Confidence Interval.

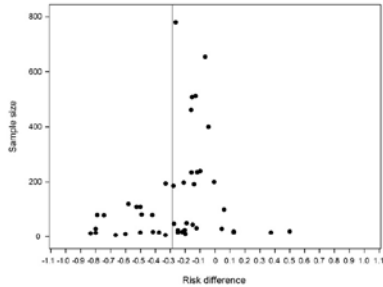


Fig. 3. "Christmas tree" graph for the evaluation of a possible publication bias in the global meta-analysis (reference line: pooled estimate of vaccines).

(Supplementary Table 2). Similarly, a positive effect of vaccination in terms of reducing the percentage of lesions (epithelial conglutination in intestinal tracts) was found (Supplementary Table 2).

4. Discussion

Evaluation of the efficacy of vaccination for controlling *Salmonella* infection in pigs has been hampered by the wide variety of vaccines, methodologies, and groups selected as comparison that have been used in the past, which results in a number of factors confounding the results. Additionally, multiple approaches for measuring vaccine efficacy can be used, further complicating the identification of what constitutes an effective vaccine response. The systematic literature review performed here shows that the vast majority of studies found a beneficial (overall effect in reducing proportion of culture-positive samples of 28.6%) though variable (95% CI: 22.4 to 34.7) effect of vaccination regardless of the vaccine type and protocol used for vaccination. This study provides an update on the existing knowledge on vaccine efficacy against *Salmonella* in swine, including 11 papers that were published since the last systematic review on this topic was published (Wisener et al., 2014) and 10 papers published that had not been included in previous systematic reviews due to the inclusion criteria applied (Denagamage et al., 2007; Wilhelm et al., 2012; Wisener et al., 2014; FAO/WHO, 2016). Overall, the predominant type of study design (experimental trials performed on weaning pigs) was the same identified in those reviews, although lack of information on other details such as vaccine serotype used and dose and route of administration prevents further comparisons (Denagamage et al., 2007; Wilhelm et al., 2012; Wisener et al., 2014; FAO/WHO, 2016).

Our results largely agree with those previously reported, although the focus of previous reviews was slightly different. Denagamage et al. (2007) evaluated the efficacy of vaccination only in market weight finisher pigs, and concluded that, though the association between vaccination and *Salmonella* reduction was promising, it could not be considered definitive due to design and reporting deficiencies, and did not perform pooled data analyses (Denagamage et al., 2007). Wilhelm et al. (2012) aimed at comparing vaccine efficacy obtained in challenge versus field trials in studies performed under specific conditions. In this study, an overall protective effect was observed in challenge trials (Odds Ratio = 0.3, 95% CI 0.21–0.45) while the high heterogeneity ($I^2 = 81%$) between the low number of field trials included ($n = 3$) did not allow the calculation a pooled estimate (Wilhelm et al., 2012). Wisener et al. (2014) compared results obtained during and at the end of the trials

evaluated and also demonstrated a protective effect of the vaccine, though this was less pronounced when the effect was measured at the end of the trial (OR = 0.36, 95% CI 0.14–0.92) compared with previous stages (OR = 0.24, 95% CI 0.07–0.78) (Wisener et al., 2014). The report of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO, 2016) also concluded that vaccination in controlled and experimental trials led to a reduction of the prevalence of *Salmonella*, but with a high degree of heterogeneity in the vaccine effect (FAO/WHO, 2016). This heterogeneity is probably due to the lack of distinction between the different vaccination strategies (live vs attenuated or serotype used, among others). Our results, obtained through the analysis of a large sample size and different inclusion criteria, confirm the protective effect of vaccines against *Salmonella* and also allow a better understanding of the effect of different types of vaccines (live vs attenuated), serotypes used and routes of administration.

The difference in the percentage of fecal or tissue culture-positive animals was selected as the measure of vaccine efficacy in the meta-analysis since it was the most commonly reported measure (provided in 72.6% of the trials). In addition, culture-positives can reflect the acute status of infection compared with serology or histological examinations, which can have little relationship to the likelihood of shedding the bacteria (Suaw et al., 2006; Kränker et al., 2003). In some studies (De Ridder et al., 2014; Gibson et al., 1999; Roesler et al., 2004; Springer et al., 2001; Takada-Iwao et al., 2013) the efficacy was measured on culture results obtained on both fecal and tissue samples, with the former offering a similar or, on occasions (Roesler et al., 2004), superior estimate, though differences were never statistically significant. Here, results of fecal culture, when available, were preferred for the pooled analysis because they may better represent the hazard posed by infected animals to the public health (Wisener et al., 2014). Results derived from the evaluation of lesions (without isolation) and deaths must be interpreted with more caution since they may be biased by factors that affect the welfare of the animal other than the *Salmonella* infection, especially in field conditions.

The pooled estimates obtained in this study confirmed a significant though usually moderate effect of vaccination in the reduction of the prevalence of *Salmonella* colonization and excretion in pigs regardless the type of vaccine (attenuated/inactivated) or serotype (Typhimurium/Choleraesuis) used, although a significant level of heterogeneity existed between studies. The strongest effect was observed when a combination of live and inactivated vaccines was administered, which could be due to the boost effect of a double vaccination in the same animal. In the three trials using this approach, sows were primed at eight weeks of pregnancy and boosted three weeks later, combining doses of a live vaccine (orally) and of an inactivated type (intramuscularly). Furthermore, in one trial the piglets were also immunized during the second and fifth week of life. Generalizability of results is however limited due to the small number of trials based on combination of attenuated and inactivated vaccines ($n = 3$). Although attenuated live vaccines generally provide better protection than killed vaccines (Collins and Campbell, 1982; Linde, 1983; Robertsson et al., 1983), which is attributable to the ability of the live agent to stimulate an effective cell-mediated immune response, pooled estimates of efficacy of both inactivated and attenuated values in the published literature were found to be similar (Table 4).

The selection of a vaccination protocol to reduce *Salmonella* colonization and excretion is also complicated due to the array of different serovars that can be naturally found in swine, as humoral immunity is serogroup specific while cell mediated immunity is mostly non-serogroup specific (Foss et al., 2013). Not surprisingly, *S. Choleraesuis* and *S. Typhimurium* were the most commonly used serotypes in the reviewed studies, as they are two of the most reported serotypes in swine (Foley et al., 2008), although their geographic distribution differs (*S. Choleraesuis* is more commonly found in America and *S. Typhimurium* is the most common serotype in Europe). That distribution was also reflected in the geographic locations where studies with each serotype were carried out, with 78.6% of studies using *S.*

Choleraesuis vaccines performed in the USA, Canada and Brazil, and 64.3% of the studies describing the use of *S. Typhimurium* vaccines performed in Europe.

While no effect of the serotype was observed on the efficacy recorded for attenuated vaccines, a higher efficacy of inactivated vaccines against *S. Choleraesuis* were found in the two trials that evaluated this alternative (Table 4), what could be due to the larger importance of systemic immunity against infections with this serotype. However, both trials (Draayer, 1986; Takada-Iwao et al., 2013) were carried out in a limited sample of animals ($n = 5$ in both the intervention and control group) and in experimentally challenged pigs, in comparison with trials evaluating the inactivated type against *S. Typhimurium*, which were mostly performed under field conditions (5/6) and included a larger number of animals (mean = 915). This could also explain our findings, given that an overall higher efficacy was observed in challenge studies.

The slightly higher risk difference observed in challenge trials compared to field trials could be explained by a more even exposure to the pathogen in both vaccinated and control animals (dose, time of exposure, etc.) in challenge trials in contrast to field trials where the force of infection, shedding of the pathogen and rate of contacts were likely not homogeneous. These issues may have the potential to result in uncontrolled biases (Wilhelm et al., 2012). Another possible explanation for this result could be related to publication bias, as experimental trials reporting a relatively high effect are usually more likely to be published compared with trials that report a low or negative effect (Borenstein et al., 2009).

A higher efficacy was found for experimental compared with commercial vaccines, although the very large heterogeneity found in the results reported for the latter category makes interpretation of its pooled efficacy estimate difficult.

When more than one treatment group was compared against the same control group within a study, each pair was included as a separate comparison (trial) within a common publication, potentially leading to overestimating the precision of the estimate. This problem has been described before in this context (Wisener et al., 2014), although here the inclusion of a higher number of studies decreased the trial/study ratio compared with previous meta-analyses [1:1.7 vs 1:2 (Wilhelm et al., 2012) and 1:2.5 (Wisener et al., 2014)], which may have decreased this undesired effect.

Even though one of the objectives of this study was to be more inclusive than in previous reviews, what led to a more heterogeneous set of studies being identified, only 45 studies fulfilled our inclusion criteria. The potential effect of the characteristics of the study on vaccine efficacy was considered by stratifying for the relevant variables whenever possible, but in certain cases sample size was too small, what led to high uncertainty regarding the specific impact of certain factors on vaccine efficacy (Tables 4 and 5). In addition, no information on several other production and management factors (stock density, herd size, constant flow versus all-in-all-out and indoors versus outdoors systems) that may potentially influence it was provided in most of the studies, thus making impossible to assess their effect. Thus, more studies may be needed in order to further clarify their importance especially under field conditions (only 29.5% of the studies reviewed here belonged to this category) and in finisher pigs (that pose the highest risk of contamination of the food chain).

5. Conclusions

After reviewing available evidence, a beneficial though variable effect of vaccination against *Salmonella* on colonization and shedding was observed. Attenuated and inactivated vaccines showed similar efficacy, whereas a higher protection was observed on animals receiving both vaccine types in a reduced number of studies. A serotype-specific effect on vaccine efficacy was also observed, in particular for inactivated vaccines including *S. Choleraesuis*.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was partly funded by Interporc (Interprofesional Poccino de Capa Blanca), (agreement number: 152/2015) and the Global Food Venture (grant number: # W102) - MDrive initiative (<https://mndrive.uma.edu/food/projects?page=1>). The authors are grateful to S. Gonzalez for his help with figure editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.005>.

References

- Arguello, H., Carvajal, A., Naharn, G., Rubio, P., 2013. Evaluation of protection conferred by a *Salmonella* Typhimurium inactivated vaccine in *Salmonella*-infected finishing pig farms. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 489–498.
- Baloda, S.B., Christensen, L., Trajcevska, S., 2001. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2859–2862.
- Baum, D.H., Harris, D.L., Roof, M.B., Nielson, B., Holck, J.T., Polson, D.P., Baik, J., 1997. Use of SC54 for the reduction of *Salmonella* in swine. Proceedings of the 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork (Copenhagen, Denmark): 215.
- Bhattacharyya, H.M., Mahalobis, M., Garguli, J.L., Chakraborty, D., Chatterjee, A., Sengupta, D.N., 1978. A trial on swine paratyphoid vaccine. *Indian J. Anim. Health* 17, 31–33.
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T., Rothstein, H.R., 2009. Introduction to Meta-analysis. John Wiley & Sons Ltd West Sussex, UK.
- Boyer, F., Haezebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* 130, 1–19.
- Charles, S.D., Abraham, A.S., Trigo, E.T., Jones, G.F., Seiglie, T.L., 2000. Reduced shedding and clinical signs of *Salmonella* Typhimurium in nursery pigs vaccinated with a *Salmonella* Choleraesuis vaccine. *Swine Health Prod.* 8, 107–112.
- Chu, C.Y., Wang, S.Y., Chen, Z.W., Chen, M.S., Huang, J.P., Chen, J.J., Fong, L.S., Shiao, A.I., Tsai, J.L., Wu, C.L., 2007. Heterologous protection in pigs induced by a plasmid-cured and *crp* gene-deleted *Salmonella* choleraesuis live vaccine. *Vaccine* 25, 7031–7040.
- Coc, N.E., Frank, D.E., Wood, K.L., Roth, J.A., 1992. Alteration of neutrophil function in BCG-treated and non-treated swine after exposure to *Salmonella* typhimurium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33, 37–50.
- Collins, F.M., Campbell, S.G., 1982. Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3, 5–66.
- Davies, P.R., 2011. Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 183–201.
- Davies, R., Breslin, M., 2003. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella enteritidis* on commercial laying chicken farms. *Vet. Rec.* 153, 671–677.
- De Koeber, L., Maes, D., Dewulf, J., Pasmans, F., Boyer, F., Haezebrouck, F., Méroc, E., Kieck, S., Leyman, B., Buraye, P., Van der Stede, Y., 2013. Effect of a DNA vaccine with and without in feed use of coated calcium butyrate on transmission of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *BMC. Vet. Res.* 9, 1–8.
- De Koeber, L., Maes, D., Dewulf, J., Buraye, P., Pasmans, F., Boyer, F., Haezebrouck, F., Van der Stede, Y., 2014. Use of a live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine on farrow-to-finish pig farms. *Vet. J.* 202, 303–308 (London, England: 1992).
- Deeks, J.J., Higgins, J., Altman, D.G., 2008. Analysing data and undertaking meta-analyses. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Cochrane Book Series*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 243–266.
- Delgado, M., 2010. Revisión sistemática de ensayos Metaanálisis. 3ª ed. Signo Barcelona.
- Derangamage, T.N., O'Connor, A.M., Sargeant, J.M., Rajic, A., McKeen, J.D., 2007. Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 530–549.
- Dewes, R.F., 1978. Effects of vaccination with killed *Salmonella* bacteria. *N. Z. Vet. J.* 27, 109–107.
- Demerech, J.M., 2012. Micro (MAR) for STSS Statistics. Meta-analysis OR, RR, RD, IR, ID, B & MD Combined (Computer Program). V2012.03.20. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Draayer, H.A., 1986. Protecting Weaning Pigs against Salmonellosis. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician*. 81, pp. 776–777.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13 (12), 4329.
- Farzan, A., Friendship, R.M., 2010. A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding

- and weight gain in pigs. *Can. J. Vet. Res. = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 74, 258–263.
- Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenesis of such isolates. *J. Anim. Sci.* 86, E149–E162.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2016. Interventions for the Control of Non-typhoidal *Salmonella* in Beef and Pork: Meeting Report and Systematic Review. FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series 30, p. 295.
- Foss, D.L., Agir, T.S., Bode, D., Denarvester, D.A., Jolie, R., Knich, R.L., Lohse, R.M., Reed, M., Kosey, L.L., Schneider, P.A., Taylor, L.P., Wilby, M.S., 2013. Protective immunity to *Salmonella enterica* is partially serogroup specific. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155, 76–86.
- Gibson, K.J., Baha, T., Frank, K.K., Charles, S.D., Triga, E., 1999. Investigation into the capability of a *Salmonella choleraesuis* live vaccine to reduce the shedding of *Salmonella typhimurium* in swine. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, pp. 302–304.
- Gradassi, M., Pescioli, M., Marinelli, N., Ruggeri, J., Petroni, P., Hassan, W.H., Raffaela, M., Scaglione, F.E., Ammendola, S., Battistoni, A., Aborali, G.L., Pasquali, P., 2013. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZetaABC transporter: an efficacious orally administered mucosal vaccine against salmonellosis in pigs. *Vaccine* 31, 3695–3701.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., 2001. Long-term survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114, 370–374.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Ackermann, M.R., 1995. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet. Microbiol.* 47, 43–50.
- Groniga, K.J., Springer, E., Branschmidt, M., Panitzsch, D., 2000. *Salmonella* derby cross-protection study. *Vet. Ther. Res. Appl. Vet. Med.* 1, 59–62.
- Haezebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, H., Maes, D., Durbelle, R., Deontere, A., 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 100, 255–268.
- Han, Y., Liang, A., Han, L., Guo, A., Jiang, X., Yang, L., 2014. Efficacy and safety of an oral somatostatin DNV vaccine without antibiotic resistance gene in promoting growth of piglets. *Scand. J. Immunol.* 79, 244–250.
- Hamed, T., Odeid, N., Kikuchi, Y., Takagi, M., Kuritaki, T., Miki, T., Arai, S., Danbara, H., 2011. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Choleraesuis* slyA mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 369–408.
- Hanna, J., Ellis, W.A., O'Brien, J.J., 1979a. Immunization of pregnant sows with a live *Salmonella choleraesuis* vaccine. *Vet. Microbiol.* 3, 303–309.
- Hanna, J., McCracken, R., O'Brien, J.J., 1979b. Evaluation of a live *Salmonella choleraesuis* vaccine by intranasal challenge. *Res. Vet. Sci.* 26, 216–219.
- Hayles, J., 2005. *Salmonella* control in pigs using a live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine (TD *Salmonella* vaxdog, T. Lehmann animal health). *Pig. J.* 55, Figgins, J.P., Thompson, S.G., 2002. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* 21, 1539–1558.
- Hur, J., Lee, J.L., 2010. Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. *Vet. Microbiol.* 143, 270–276.
- Hur, J., Song, S.O., Lim, J.S., Chang, I.K., Lee, J.L., 2011. Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella typhimurium* vaccine for protection against *Salmonella* infections in growing piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139, 250–256.
- Imberechts, H., De Fillette, M., Wray, C., Jones, Y., Godard, C., Pohl, P., 1998. *Salmonella typhimurium* phage type DT104 in Belgian livestock. *Vet. Rec.* 143, 424–425.
- Kennedy, M.J., Varney, Jr., R.J., Sanchez, M.S., Rzepkowski, R.A., Kelly, S.M., Curtiss 3rd, R., 1999. Attenuative and immunogenicity of *Delacya* *Delacp* derivatives of *Salmonella choleraesuis* in pigs. *Infect. Immun.* 67, 4628–4636.
- Kramer, T.H., Pardon, P., Marly, J., Bernard, S., 1987. Conjunctival and intramuscular vaccination of pigs with a live avirulent strain of *Salmonella choleraesuis*. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1072–1076.
- Kramer, T.H., Roof, M.B., Matheson, E.R., 1992. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. *Am. J. Vet. Res.* 53, 444–448.
- Kranke, S., Alban, L., Boes, J., Dahl, J., 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2282–2288.
- Ku, Y.W., McDonough, S.P., Palaniappan, R.L., Chang, C.F., Chang, V.F., 2005. Novel attenuated *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* strains as live vaccine candidates generated by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 73, 8194–8203.
- Lee, H., Jin, S., Cho, Y., Kim, Y., Kim, J., Kim, J., 2007. Protective effects of mix crude outer membrane protein *Salmonella* vaccine against salmonellosis in chickens and pigs. *Kor. J. Vet. Res.*
- Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Quessy, S., 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can. J. Vet. Res. = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 64, 27–31.
- Leyman, B., Boyen, F., Verbrugghe, E., Pays, A.V., Haezebrouck, F., Pasmans, F., 2012. Vaccination of pigs reduces *Salmonella typhimurium* numbers in a model mimicking pre-slaughter stress. *Vet. J.* 194, 250–252.
- Linde, K., 1983. Stable, highly immunogenic mutants of "Salmonella" with two independent, attenuating markers as potential live vaccine and their validity for "Sibgella" and other bacteria. *Dev. Biol. Stand.* 53, 15–28.
- Lindner, T., Springer, S., Steinbach, G., Geyer, E., Selbitz, H.J., 2002. Immunoprophylaxis - a contribution to control *Salmonella typhimurium* infection in pigs. *Tierarztl. Prax.* 30, 302–304.
- Lumsden, J.S., Wilkie, B.N., 1992. Immune response of pigs to parenteral vaccination with an aromatic dependent mutant of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Vet. Res. = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 56, 306–309.
- Lumsden, J.S., Wilkie, B.N., Clarke, R.C., 1991. Resistance to fecal shedding of salmonellae in pigs and chickens vaccinated with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1784–1787.
- Macaskill, P., Waller, S.D., Irwig, L., 2001. A comparison of methods to detect publication bias in meta-analysis. *Stat. Med.* 20, 641–654.
- Mbes, D., Gibson, K., Trigo, E., Szczak, A., Graz, J., Carlton, A., Baha, T., 2001. Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella choleraesuis* vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114, 339–341.
- Maistroteri, P., Chabalgoity, J.A., Dunstan, S.J., Maskell, D.J., Dougan, G., 2001. *Salmonella* immune responses and vaccines. *Vet. J.* 161, 132–164 (London, England: 1997).
- McKinram, K.C., 1993. Differential diagnosis of suspected swine fever. *Vet. Rec.* 133, 90.
- Merialdi, G., Bergazzi, G., Boriliani, P., Tittarelli, C., Borci, M., Dincau, M., Dottori, M., 2008. Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. *Zoonoses Public Health* 55, 222–226.
- Müller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E., Barber, D.A., 2005. Influence of *Salmonella* in pigs pre-harvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J. Food Prot.* 08, 1708–1708.
- Mohr, D., Liberata, A., Tetzlaff, J., Altman, U.G., 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 6, e1000097.
- Nash, W.A., 2004. *Salmonella* control in poultry and pigs. *Pig. J.* 54, 146–150.
- Orman, K., Leyk, W., Jungnick, S., Waldmann, K.H., Selbitz, H.J., 2004. Vaccination trials with a *Salmonella typhimurium* live vaccine for control of salmonella infections in breeding stock. *Prakt. Tierarztl.* 83, 273–280.
- Pescioli, M., Gradassi, M., Marinelli, N., Ruggeri, J., Petroni, C., Raffaela, M., Magistrati, C.F., Battistoni, A., Pasquali, P., Aborali, G.L., 2013. *Salmonella typhimurium* lacking the ZetaABC transporter is attenuated and immunogenic in pigs. *Vaccine* 31, 2868–2873.
- Robertson, J.A., Lindberg, A.A., Hoiseth, S., Stocker, B.A., 1983. *Salmonella typhimurium* infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect. Immun.* 41, 742–752.
- Roesler, U., Mang, H., Schroder, L., Maier, S., Arnold, T., Lehmann, J., Trajen, U., Herzel, A., 2004. Oral vaccination of pigs with an invasive *g7A-gpA-rpB* *Salmonella typhimurium* mutant. *Vaccine* 23, 595–603.
- Roesler, U., Hehler, P., Waldmann, K.H., Trajen, U., Herzel, A., 2006. Immunization of sows in an integrated pig breeding herd using a bacteriophage inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in the offspring. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 224–228.
- Roof, M.B., Deitchmoff, D.D., 1985. Safety, efficacy, and duration of immunity induced in swine by use of an avirulent live *Salmonella choleraesuis*-containing vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 56, 39–44.
- Rozsgo, M.H., 2011. Vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in pigs. *Vet. Rec.* 169, 551–552.
- Ruggeri, J., Pescioli, M., Gattaroli, B., Scaglione, F.E., Pregel, P., Ammendola, S., Battistoni, A., Bolo, E., Aborali, G.L., Pasquali, P., 2014. Parenteral administration of attenuated *Salmonella typhimurium* DelazetaABC is protective against salmonellosis in piglets. *Vaccine* 32, 4032–4038.
- Schwarz, P., Kich, J.D., Kolb, J., Cardoso, M., 2011. Use of an avirulent live *Salmonella choleraesuis* vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. *Vet. Rec.* 169, 553.
- Selke, M., Meers, J., Springer, S., Frank, R., Gellach, G.F., 2007. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative marker vaccine. *Infect. Immun.* 75, 2476–2483.
- Springer, S., Lindner, T., Steinbach, G., Selbitz, H.J., 2000. Investigation of the efficacy of a genetically stable live *Salmonella typhimurium* vaccine for use in swine. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114, 342–345.
- Stabel, T.J., Mayfield, J.E., Morfit, D.G., Wannemuehle, M.J., 1993. Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella choleraesuis* [delta *cyo-12* delta (*cpd*)] mutant containing a recombinant plasmid. *Infect. Immun.* 61, 610–616.
- Straw, R.E., Zimmerman, J.J., Dallaire, S., Taylor, D.J., 2006. Diseases of Swine, ninth ed. 75). Elsevier Publishing Professional, Ames Iowa U.S.A.
- Takada-Iwata, A., Seki, M., Nakazumi, M., Sotama, J., Okada, S., Okada, Y., Imai, Y., Sato, S., 2013. Porcine coronavirus type 2 (PCV2) vaccination reduces PCV2 in a PCV2 and *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* coinfection model. *Vet. Microbiol.* 162, 219–223.
- Wales, A.D., Davies, R.H., 2016. *Salmonella* vaccination in pigs: a review. *Zoonoses Public Health*.
- Wilhelm, B., Rajic, A., Pirker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazli, A., Wilkins, W., McEwen, S.A., 2012. Assessment of the efficacy and quality of evidence for live on-farm interventions for *Salmonella* reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 107, 1–20.
- Wisner, L.V., Sargeant, J.M., O'Connor, A.M., Faires, M.C., Glass-Gastra, S.K., 2014. The evidentiary value of challenge trials for three pre-harvest food safety topics: a systematic assessment. *Zoonoses Public Health* 61, 440–476.
- Xu, H.K., Isha, H.S., Moore, C.W., King, R.A., 1983. Correlation of antibody titres induced by vaccination with protection in mouse typhoid. *Vaccine* 1, 725–728.

7. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral recoge una serie de investigaciones diseñadas con el fin de demostrar la aplicabilidad y utilidad de diferentes métodos cuantitativos en el estudio epidemiológico de enfermedades zoonóticas.

El interés de esta tesis doctoral en las enfermedades zoonóticas es derivado de su compleja epidemiología, que afecta a diversos compartimentos (animal, humano, ambiental) y pone de manifiesto la necesidad de una aproximación "Una Salud" (*One Health*), concepto que reconoce que la salud de los seres humanos, de los animales y el medio ambiente están interconectados (Schwabe, 1984). Las zoonosis, que representan una amenaza tanto para la sanidad animal como para la salud pública (Cripps, 2000) al ser enfermedades que pueden ser transmitidas de animales domésticos y salvajes al ser humano (Kahn, 2006), son un claro ejemplo de la interconectividad referida en "Una Salud". Estas zoonosis pueden causar una importante morbilidad y mortalidad en el ser humano y demás especies animales, entre ellas, las de producción, lo que puede dar lugar también a una reducción de la disponibilidad de alimentos de origen animal y por tanto del bienestar de las comunidades que dependen de su producción (Cripps, 2000). En la pasada década se ha observado un incremento significativo en la circulación de agentes infecciosos (Destoumieux-Garzón et al., 2018), siendo en su mayoría de origen zoonótico (Taylor et al., 2001; Wolfe et al., 2007) y, como se ha observado en el caso de las epidemias de influenza aviar, Ébola y Zika, la interfaz humano-animal-medio ambiente juega un papel vital en la evolución y emergencia de estos patógenos (Destoumieux-Garzón et al., 2018). La epidemiología de estas enfermedades es, como decimos, es especialmente compleja, pero nuestra hipótesis de trabajo es que la aplicación de métodos cuantitativos capaces de integrar la información de diversas disciplinas como la microbiología, la demografía, la biología molecular, etc. (Dohoo, 2003; Thursfield, 2007; Perez, 2015) puede resultar especialmente útil en la investigación sistemática del problema que causan.

Entre los responsables de los problemas emergentes de salud del siglo XXI figuran la destrucción y fragmentación de los hábitats naturales, la contaminación medio ambiental y el cambio climático; éstos se han convertido en catalizadores de una mayor incidencia y extensión geográfica de los agentes infecciosos (Daszak et al., 2001; Patz et al., 2004; Levy, 2015). De igual manera, la globalización del comercio e intercambio de animales (WHO/FAO, 2002), con el consecuente aumento del movimiento de humanos, animales y plantas con sus respectivos agentes infecciosos, han posibilitado la colonización de nuevos territorios por parte de estos últimos. Así mismo, la industrialización de la agricultura (Stoate et al., 2001; Stoate et al., 2009), que ha dado lugar a prácticas intensivas de cría y producción, ha generado un estrés en los animales que propicia la selección y propagación de agentes infecciosos (Destoumieux-Garzón et al., 2018). Este aumento de la incidencia de enfermedades puede ser a su vez responsable del uso abusivo de pesticidas y antibióticos y, por tanto, de la emergencia de vectores y bacterias resistentes (Tantely et al., 2010; Chouaibou et al., 2016; Holmes et al., 2016).

El objetivo de esta tesis era demostrar la versatilidad de los métodos cuantitativos para el estudio epidemiológico de una variedad de enfermedades zoonóticas. Con el fin de tener un abanico representativo, la selección de las enfermedades abordadas se llevó a cabo en base a su diferente etiología, transmisión y epidemiología, entre otras características. Respecto a la primera enfermedad, la leishmaniosis, está producida por parásitos protozoarios del género *Leishmania* y se transmite a través de vectores (Bañuls et al., 2007). Aunque la leishmaniosis es endémica en la cuenca mediterránea, donde *L. infantum* es la especie responsable y el perro el principal hospedador (Boelaert et al., 2000; Gallego, 2004; Gálvez et al., 2010), el aumento de casos en humanos (en esta región, así como en latitudes mayores), hace que se considere a esta enfermedad re-emergente (Gramiccia and Gradoni, 2005; Ready, 2010). En España, la prevención de la enfermedad se lleva a mediante la vacunación de perros y el uso de productos repelentes (Lladro et al., 2016). Por otro lado, la tuberculosis bovina está producida por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la principal vía de transmisión es la respiratoria (Michel et al., 2010). En nuestro

país, esta enfermedad es endémica en el principal hospedador animal, el vacuno, así como en pequeños rumiantes y especies salvajes (Martínez-López et al., 2014). Sin embargo, los casos en humanos son esporádicos, a diferencia de lo observado en países en vías de industrialización (Dean et al., 2018). Para su control, se ha establecido en España un programa de erradicación de la enfermedad en ganado vacuno (MAPAMA, 2017b). Por último, la salmonelosis está producida por bacterias Gram negativas del género *Salmonella* y se transmite vía fecal-oral (Gomez et al., 1997). En España, la salmonelosis es endémica tanto en el hospedador animal (aves y cerdos) como en el ser humano, a raíz de brotes de origen alimentario (Dominguez et al., 2007). El control de *Salmonella* se lleva a cabo a lo largo de la cadena alimentaria y en la manipulación de alimentos (EFSA, 2017).

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica parasitaria producida por protozoos del género *Leishmania* y que afecta tanto a humanos como a otros mamíferos (Bañuls et al., 2007). En la cuenca Mediterránea, donde la leishmaniosis es endémica, *L. infantum* es el agente responsable de la enfermedad (Boelaert et al., 2000) y los flebótomos *P. perniciosus* y *P. ariasi* son los principales vectores (Aransay et al., 2003; Franco, 2010; Galvez et al., 2011; Maroli et al., 2013), mientras que los perros están considerados el principal reservorio doméstico (Gallego, 2004; Gálvez et al., 2010). En la Comunidad de Madrid, se registraron anualmente un total de 12 a 25 casos en humanos durante el periodo 2000-2009. Sin embargo, un brote acontecido en el suroeste de la región, en los municipios de Getafe, Fuenlabrada, Leganés y Humanes de Madrid y en el que los primeros casos se remontan a julio de 2009, ha dejado a fecha de hoy más de 700 personas afectadas, el 60% con un cuadro de leishmaniosis cutánea y el 40% restante de leishmaniosis visceral (Arce et al., 2013; Gomez-Barroso et al., 2015). Y, a pesar de que la incidencia ha disminuido notablemente los últimos años, este brote continúa activo. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en el área afectada, que no detectaron cambios en la dinámica de la enfermedad en perros (Arce et al., 2013), demostraron el papel potencial de los lagomorfos, liebres y conejos, como reservorios competentes del parásito, encontrándose seroprevalencias superiores al 74% y 45%, respectivamente (Jimenez et al., 2014; Moreno et al.,

2014). Además, su capacidad de transmitir el parásito al vector fue probada en condiciones experimentales (Molina et al., 2012). Este brote, un claro ejemplo de la invasión por parte del ser humano de un hábitat natural y la consecuente modificación de la ecología de los animales que habitaban en él, fue producto de la construcción en esta área de urbanizaciones y parques donde se establecieron los lagomorfos en ausencia de depredadores (Arce et al., 2013), unido a las elevadas densidades del vector, *Phlebotomus perniciosus*, cuya presencia se vio favorecida por la presencia de escombros de las obras de aclimatación urbana y posiblemente de unos otoños más largos (Dujardin et al., 2008; WHO, 2010; Hay et al., 2013).

A pesar de que el potencial de los conejos y liebres de actuar como reservorios competentes de *L. infantum* había sido demostrado (Jimenez et al., 2014; Moreno et al., 2014), la evaluación de la importancia de su papel en la dinámica de la enfermedad y la implantación de estrategias de vigilancia y control acordes estaba impedida por el desconocimiento de la fiabilidad de las pruebas diagnósticas en estas especies. Con el fin de responder a esta pregunta, se llevó a cabo el análisis de los resultados en IFAT y PCR anidada sobre muestras de piel de oreja (porque es la zona más expuesta a la picadura del vector) de lagomorfos de la región mediante una aproximación bayesiana (Branscum et al., 2005), ya que son las pruebas comúnmente utilizadas para la detección de la infección de *L. infantum* en estas especies. El análisis de 217 conejos y 67 liebres, muestreados en dos áreas diferentes de la región de Madrid, permitió, no sólo la estimación de la fiabilidad diagnóstica de las dos pruebas anteriores, sino también la estimación de la prevalencia de leishmaniosis en cada una de las especies en áreas ajenas a la zona del brote mediante la aplicación de un modelo Bayesiano de dos poblaciones. Debido a la ausencia de información sobre la precisión de estas pruebas en lagomorfos, los priors que fueron incorporados al modelo se basaron en la evidencia recogida para otras especies, especialmente en perros, y la opinión de expertos.

Como puede observarse en este estudio, en especies sin antecedentes de esta enfermedad y, por tanto, del diagnóstico de la misma, la estadística

bayesiana demostró su utilidad en la determinación de la fiabilidad de las pruebas para el diagnóstico de la infección por *L. infantum* en lagomorfos así como de la prevalencia de enfermedad en este reservorio. A pesar de que estas pruebas habían sido extensamente evaluadas en otras especies (en el hombre, el perro y el gato), ésta representa la primera vez que un modelo bayesiano se aplica para la estimación de la fiabilidad de dichas pruebas en el caso, no sólo para el diagnóstico de la enfermedad en lagomorfos, sino para el diagnóstico de la leishmaniosis en general. Según los resultados del estudio, la sensibilidad y especificidad estimadas del IFAT hacen de esta prueba una candidata adecuada para el cribado de leishmaniosis en lagomorfos. La estimación posterior de la sensibilidad del IFAT cuando se empleó una interpretación conservadora de sus resultados (títulos <1/50 considerados negativos) estaba en consonancia con el prior empleado en el modelo, 73% (Intervalo de probabilidad posterior del 95%: 61,3 – 83,8), lo que apunta a que su sensibilidad sería similar a la observada en otras especies (Iqbal et al., 2002; Marfurt et al., 2003; Maia et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2014). Así mismo, esta sensibilidad posterior aumentó entre 5 y 10 puntos porcentuales cuando se empleó la interpretación sensible de los resultados del IFAT (títulos $\geq 1/25$ considerados positivos. Sin embargo, la especificidad estimada del IFAT fue ligeramente inferior a lo esperado (medianas de las estimaciones posteriores entre 75,9 y 80,2%) lo que podría explicarse, al menos en parte, por la reactividad cruzada con *Trypanosoma spp* (Moreno et al., 2014) cuya presencia ha sido reportada en España (Díaz-Sáez et al., 2014). Por el contrario, la sensibilidad de la PCR anidada fue limitada, con la mediana de las estimaciones posteriores entre 20 y 30%. Esta baja sensibilidad podría deberse a una carga parasitaria baja en el momento del diagnóstico o una distribución heterogénea del parásito en el hospedador, teniendo en cuenta la falta de información sobre la patogénesis de la enfermedad en esta especie. Cabe resaltar que la concentración de ADN de *Leishmania* en la piel es mayor cuanto más reciente haya sido la inoculación de los promastigotes por parte del flebótomo, como ha sido demostrado en estudios experimentales en ratones (Belkaid et al., 2000; Kamhawi et al., 2000; Nicolas et al., 2000) y en perros asintomáticos (Solano-Gallego et al., 2001; Otranto et

al., 2009). Sin embargo, desconocemos el momento de exposición al parásito de los ejemplares incluidos en el estudio (capturados a finales de la temporada de actividad del vector), que podría haber sido meses anteriores al muestreo o, incluso, años anteriores. Este hecho sería compatible con la alta proporción de animales seropositivos encontrada, considerando la larga duración de la inmunidad.

El análisis bayesiano de los datos confirmó la utilidad de las pruebas serológicas en este contexto y también arrojó luz sobre la epidemiología de la enfermedad en los lagomorfos de esta región. La prevalencia estimada en conejos fue significativamente superior a aquella en liebres, sugiriendo que la agregación de los primeros en madrigueras puede favorecer la transmisión de la enfermedad si el vector está presente, ya que se ha observado que la sangre de los conejos atrae especialmente a *P. perniciosus* (Benito-De Martin et al., 1994; Jimenez et al., 2014; Martin-Martin et al., 2014). Por otro lado, no existen datos sobre la persistencia del material genético del parásito en los tejidos de un lagomorfo infectado, aunque la ausencia de signos clínicos macroscópicos en los conejos y liebres capturados sugiere que la infección en este reservorio no debe ser severa y, por tanto, el uso de la PCR, que es más sensible en el caso de infecciones agudas, no esté indicado en este contexto. Con el fin de esclarecer estas dudas deberán llevarse a cabo investigaciones futuras.

Las zoonosis endémicas siguen representando una amenaza para la salud pública y la sanidad animal (Fenga and Pugliese, 2013) a pesar de los esfuerzos invertidos en su estudio y control. El control de enfermedades como la brucelosis, la tuberculosis bovina, la salmonelosis, la fiebre Q o diversas helmintiasis en el reservorio animal mediante la implantación de programas de erradicación y otras medidas a nivel de granja o piscifactoría ha dado lugar a una reducción significativa de su prevalencia, e incluso a su erradicación, en muchos países industrializados (Cousins and Roberts, 2001; Collins, 2006; European Food Safety et al., 2016). Aunque el riesgo de transmisión al ser humano de varias de estas enfermedades sea considerado bajo o fácilmente prevenible, un estado de inmunodepresión del individuo (a raíz de

tratamientos farmacológicos o infecciones como, por ejemplo, por VIH), pueden incrementar la susceptibilidad a estas enfermedades (Rezaei et al., 2011). Por otro lado, y a pesar del éxito de los programas de erradicación en el reservorio animal, el riesgo de transmisión al ser humano no es despreciable y la existencia de nuevas corrientes culinarias como el consumo de carne, pesado y productos derivados, como la leche, poco cocinados o sin la higienización necesaria posibilitan esta transmisión (Suk and Semenza, 2011). Por otro lado, en países en vías de industrialización, estas enfermedades continúan siendo una causa de morbilidad y mortalidad importante tanto en animales como en el ser humano (Cosivi et al., 1998; Ayele et al., 2004; Majowicz et al., 2010b; Rubach et al., 2013; Vanderburg et al., 2014; Dean et al., 2018), incluso en casos en los que la transmisión al hombre podría prevenirse a través de simples hábitos de higiene (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

La tuberculosis bovina (bTB), que está causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC; principalmente por *M. bovis* y, en menor medida, por *M. caprae*) (Collins, 2006; Michel et al., 2010), es una enfermedad zoonótica con una distribución global que presenta importantes implicaciones en la salud humana y animal (WHO, 2017; Dean et al., 2018). La infección por MTC en el principal hospedador animal y principal fuente de infección para el ser humano, el vacuno, es generalmente crónica y permanece subclínica durante largos períodos de tiempo, llegando los animales al estado infeccioso mucho antes de exhibir signos clínicos, que en cualquier caso no son nunca patognomónicos (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Por ello, las estrategias de control en el ganado están basadas en la detección y eliminación temprana de los animales infectados de la explotación mediante la aplicación de pruebas de diagnóstico ante-mortem, complementada con la inspección rutinaria en matadero (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Los casos en humanos en países industrializados se han reducido drásticamente gracias a la aplicación de las estrategias citadas junto con otras medidas como la pasteurización de la leche de consumo humano (O'Reilly and Daborn, 1995; Palmer, 2006) y la aplicación de prácticas de protección del personal profesional en el matadero (Klous et al., 2016). Sin embargo, en países como

Estados Unidos, se ha observado un aumento reciente de la incidencia de casos de tuberculosis por *M. bovis* a raíz del consumo de productos derivados de leche sin pasteurizar, como el queso fresco (CDC, 2005; Hlavsa et al., 2008), lo que señala que el riesgo de esta enfermedad no es despreciable y la importancia de una adecuada educación de la población en hábitos de higiene.

Considerando el gran esfuerzo que conlleva la erradicación de una enfermedad y teniendo en cuenta los grandes avances que ha experimentado nuestro país en este aspecto [reducción significativa de la prevalencia de tuberculosis bovina (MAPAMA, 2017b), entre otras], es de vital importancia conocer la capacidad diagnóstica de las pruebas rutinarias para no frenar dichos avances. Es por ello que se planteó el segundo estudio de este capítulo, el cual describe una situación a la que se enfrentan los programas nacionales de erradicación de enfermedades animales: la inclusión de una prueba diagnóstica cuyo rendimiento en campo en nuestro país se desconoce.

En España, el programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina (bTB) se basa en la aplicación rutinaria de la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) en animales mayores de seis semanas de edad y el uso en paralelo de la prueba de detección del gamma-interferón (γ -IFN) como prueba complementaria en explotaciones infectadas (reactores confirmados por análisis bacteriológico y/o hallazgo de lesiones compatibles con la bTB) (MAPAMA, 2017b). Existen diferentes versiones de esta última prueba, entre ellas el kit comercial IDvet (ID Screen® Ruminant IFN-g, IDvet, Grabels, France) cuyo uso en el programa de erradicación ha sido recientemente autorizado (2016). Sin embargo, la evidencia sobre su fiabilidad en un contexto epidemiológico como el de nuestro país era limitada. Por tanto, se llevó a cabo la evaluación de su sensibilidad y especificidad, cuando se utiliza junto a la IDTB, mediante una aproximación bayesiana (Branscum et al., 2005) ya que ninguna de las pruebas diagnósticas disponibles actualmente determina correctamente el estado de infección por MTC en vacuno (de la Rua-Domenech et al., 2006). El análisis de una amplia población de animales

(n= 8.426) procedentes de 78 explotaciones localizadas en la Comunidad de Madrid y Castilla y León (incluyendo los principales tipos productivos de las regiones) permitió obtener estimaciones no sesgadas. La elección de un modelo de dos poblaciones, a su vez, permitió tomar en consideración diferencias en la prevalencia de la enfermedad en las regiones sometidas a estudio, seleccionadas en parte por su alta prevalencia de bTB (MAPAMA, 2017a). Además, el muestreo de 1.181 vacas procedentes de 18 explotaciones con una prevalencia esperada alta de reactores a la prueba del γ -IFN permitió un análisis de concordancia entre los resultados de los kits IDvet y Bovigam, este último utilizado en España desde hace más de 10 años.

La estadística bayesiana había demostrado con anterioridad su utilidad en la evaluación de la fiabilidad de las pruebas para el diagnóstico de bTB (Muller et al., 2009; Clegg et al., 2011; Alvarez et al., 2012a; O'Hare et al., 2014; Bermingham et al., 2015b; Praud et al., 2015; Pucken et al., 2017) debido a las limitaciones inherentes a la aproximación con una prueba de referencia en esta enfermedad (de la Rua-Domenech et al., 2006). En dichos trabajos se pusieron de manifiesto en ocasiones importantes discordancias entre la expectativa previa sobre el rendimiento de la prueba (en muchos casos formada a partir de la comparación con pruebas de inferior rendimiento o en contextos epidemiológicos diferentes) y lo estimado al analizar los datos de campo. En el caso del estudio incluido en esta tesis doctoral también se obtuvieron resultados discordantes con respecto a otros estudios previos sobre la fiabilidad del kit IDvet, como los llevados a cabo en Francia, Bélgica y México (Validation report), en los que se obtuvieron valores más elevados de sensibilidad de la prueba (88,3%; IC 95%: 81,1 – 95,5). Sin embargo, los valores estimados en este estudio con el punto de corte recomendado por el fabricante (35) fueron significativamente inferiores, con la mediana de la sensibilidad estimada igual a 36,7% y un intervalo de probabilidad posterior entre 14,7 y 78,8, empleando para su estimación un prior similar (aunque más amplio) al empleado con anterioridad para la evaluación del Bovigam (Alvarez et al., 2012a), ya que ambas pruebas presentan la misma diana diagnóstica, la detección del γ -IFN producido por linfocitos estimulados con PPD bovina, y ambas fueron evaluadas en el mismo contexto epidemiológico.

El origen de dichas diferencias podría estar, al menos en parte, en las muy diferentes condiciones en las que se realizaron los estudios citados (Validation report): en éstos se analizó un número limitado de animales ($n < 77$), los cuales habían sido previamente positivos a PCR, cultivo o a la prueba de la IDTB, por lo que solo representaban a una subpoblación sesgada con respecto al total de animales infectados (aquellos positivos a una prueba diagnóstica), lo que podría haber dado lugar a una sobreestimación de la sensibilidad de la prueba (Lijmer et al., 1999). En nuestro estudio, en cambio, las explotaciones de origen de los animales analizados fueron seleccionadas aleatoriamente de entre todas las explotaciones infectadas en las que las pruebas de la IDTB e IDvet estaban siendo realizadas de forma rutinaria y, por tanto, constituirían una muestra más representativa de la población sobre la que se aplica la prueba.

Por otro lado, la sensibilidad estimada para el IDvet también contrasta con la estimada con anterioridad para el Bovigam (Alvarez et al., 2012a), muy superior (mediana de 89,3%, IPP 95%: 77,5 – 97,2). Este resultado, si bien sorprendente en sí mismo dado que ambas pruebas están basadas en el mismo principio, resulta esperable dado lo observado en el estudio aquí presente (menor número de reactores en el caso del IDvet) y la experiencia descrita por varios servicios veterinarios oficiales (descenso notable del número de reacciones positivas en explotaciones consideradas infectadas tras el cambio de kit). Esta diferencia entre ambos kits se hizo aún más evidente cuando el prior empleado para la sensibilidad del IDvet se sustituyó por uno no informativo en el análisis de sensibilidad (bajando la estimación posterior a un valor mediano del 41%), lo que sugiere un conflicto entre la información “a priori” y los datos de campo, y confirma la hipótesis de que el kit IDvet, con el punto de corte 35 presenta una sensibilidad significativamente inferior a la del Bovigam. Este resultado contrasta con la elevada área bajo la curva encontrada al comparar ambas pruebas (92,5%, 89,6 - 95,3), que apunta en cambio a un rendimiento potencial más parejo entre ambas pruebas si se modifica el punto de corte (de modo que se requiera una diferencia menor entre la respuesta a la estimulación con PPD bovina y la registrada con PPD aviar para definir a un animal como reactor). Cuando se emplearon los puntos

16 y 4 para la interpretación de los resultados del IDvet, las estimaciones posteriores de sensibilidad del mismo alcanzaron valores superiores, 49,0% (IPP 95%: 24,8 – 94,1) y 56,0% (IPP 95%: 30,8 – 96,3), manteniendo una alta especificidad (medianas posteriores superiores al 93,9%), aumentando también en gran medida la concordancia de los resultados obtenidos con el kit Bovigam. Considerando que en la Unión Europea el uso de la prueba de detección de γ -IFN se aplica para maximizar el número de animales infectados detectado (MAPAMA, 2017b), ya que es capaz de identificar animales en fases más tempranas de la infección en comparación con la prueba de la IDTB (Pollock et al., 2005; Anon, 2006), la modificación del punto de corte del IDvet sería una aproximación razonable cuando se analizan muestras de explotaciones infectadas.

En lo que respecta a la fiabilidad estimada de la IDTB, ésta estuvo en consonancia con lo observado en estudios anteriores (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Alvarez et al., 2012a), y se reflejó en el solapamiento de las distribuciones de las estimaciones posteriores con aquellas de los priors, tanto para su sensibilidad como para su especificidad. La baja correlación entre los resultados de la IDTB y del IDvet estimada en el modelo bayesiano está en consonancia con un escenario donde los animales están sometidos a un análisis rutinario con IDTB, por lo que los reactores a piel ya han sido retirados cuando se introduce la prueba del γ -IFN por primera vez (Monaghan et al., 1994; Neill et al., 1994; Wood and Jones, 2001; Vordermeier et al., 2004; Pollock et al., 2005; Casal et al., 2017), como ya había sido observado con el Bovigam (Alvarez et al., 2012a). Este hecho ratifica la utilidad de la aplicación de las pruebas de detección de γ -IFN en paralelo a la prueba de la piel para maximizar la sensibilidad diagnóstica (Neill et al., 1994; Aranaz et al., 2006a). Por otro lado, la diferencia en las prevalencias estimadas para las regiones de estudio, con un ratio similar al reportado entre Castilla y León y la Comunidad de Madrid en 2016 (MAPAMA, 2017a), confirma la idoneidad del modelo de dos poblaciones en este estudio.

Los resultados de este estudio, los cuales sugieren que el kit IDvet presenta una sensibilidad menor que el Bovigam para el diagnóstico de bTB en

explotaciones de vacuno infectadas en nuestro país y cómo ésta sensibilidad podría mejorarse mediante la interpretación de la prueba con puntos de corte alternativos, apoyan la decisión de reducir el punto de corte del IDvet para su aplicación en el programa de erradicación de la bTB en España (IDvet, 2017).

Los dos estudios anteriores demuestran la aplicabilidad del análisis bayesiano en la evaluación de la fiabilidad de pruebas diagnósticas. Las diferencias entre ambos estudios (disponibilidad de información previa, estructura de las poblaciones analizadas, tipo de prueba diagnóstica a evaluar) demuestran que la aplicabilidad de esta aproximación no está condicionada por la naturaleza de las pruebas en estudio ni por las demás circunstancias que las rodean, como la infección a detectar o el escenario. En ambos estudios se empleó un modelo de dos pruebas diagnósticas y dos poblaciones, basado en un muestreo multinomial, en el que la muestra de animales analizados representa un subconjunto del censo total de la población (Branscum et al., 2005). Sin embargo, la relación entre los resultados de las dos pruebas diagnósticas contempladas en el modelo fue asumida de manera diferente en cada estudio: en el caso de la tuberculosis bovina se asumió que los resultados a las dos pruebas evaluadas eran dependientes, dado que se basaban en la detección del mismo tipo de fenómeno (basado en la respuesta inmune de base celular), mientras que en el caso de la leishmaniosis se asumió que los resultados eran independientes dado que una prueba está dirigida a detectar la respuesta inmune inducida por la infección (IFAT) y la otra la presencia misma del parásito (PCR) (Gardner et al., 2000; Dendukuri and Joseph, 2001; Georgiadis Marios et al., 2003; Kostoulas et al., 2017). Un aspecto controvertido en este tipo de análisis es la selección de los *priors* (Gardner, 2002; Carlin, 2009). En ambos estudios y para mínimo una de las pruebas en evaluación, la selección de los *priors* tuvo que realizarse en base a información extraída de investigaciones realizadas en condiciones parecidas pero no iguales a las aquí analizadas porque no estaban disponibles; en el primero estudio y, en concreto, para el IDvet, los *priors* que se utilizaron estaban basados en otra prueba, el Bovigam, que aunque comparte diana diagnóstica con el IDvet, ha quedado demostrado que no son comparables, y; en el segundo estudio, los *priors* de ambas pruebas se

seleccionaron en base a lo descrito en otras especies. Aun así, el único conflicto que se observó entre esta información “a priori” y los datos de campo fue en el caso de la sensibilidad del IDvet, donde el prior parecía informar en exceso al modelo dando lugar a una sobreestimación de ese parámetro, hecho que no ocurrió para la especificidad del IDvet ni para el resto de parámetros en este modelo ni en el del segundo estudio.

La limitación de estos estudios, como cualquiera de evaluación diagnóstica, es la imposibilidad de generalizar los resultados encontrados sin su previa verificación en otros contextos epidemiológicos y condiciones alternativas.

Una vez establecida la fiabilidad de la herramienta diagnóstica utilizada para la determinación del estado de enfermedad (positivo/negativo) de la unidad de estudio (individual o rebaño) ésta pueda emplearse en estudios destinados a evaluar los patrones espacio-temporales de la enfermedad y el impacto que las medidas de control implantadas puedan tener sobre éstas. En el trabajo incluido en el capítulo dos y el primero del capítulo tres se explora la aplicación de herramientas más avanzadas para responder a varias preguntas que aún persisten sobre la epidemiología de la tuberculosis bovina en España.

El progreso en el control de la tuberculosis bovina en el hospedador animal no es uniforme, generalmente debido a la influencia de diversos factores epidemiológicos que limitan el éxito de los programas de erradicación (Allen et al., 2018). Sin embargo, el uso del análisis espacial puede ayudar a identificar *clusters* de persistencia de la enfermedad y contribuir así a la identificación de los factores allí presentes (Ward and Carpenter, 2000a) y, por tanto, a la implementación de medidas de control dirigidas a esos factores. Por ello, el estudio del segundo capítulo de la tesis tuvo como objetivo la aplicación de técnicas de análisis espacial con el fin de determinar la dinámica de transmisión espacio-temporal de la bTB en explotaciones de vacuno de una región de alta prevalencia, la Comunidad de Madrid (MAGRAMA, 2013), durante los años 2010-2012.

La aplicación de esta aproximación analítica reveló una distribución heterogénea de la bTB a lo largo de la Comunidad de Madrid en los años de

estudio, en concordancia con estudios anteriores en ganado bovino (Perez et al., 2002b; Allepuz et al., 2011) y fauna salvaje (Olea-Popelka et al., 2003; Olea-Popelka et al., 2005) en otros escenarios, con el hallazgo en esta ocasión de un *cluster* de alta prevalencia mantenido a lo largo de los tres años de estudio (denominado área de alto riesgo) que incluía un total de 157 explotaciones de la zona norte de la región. Esta distribución heterogénea de la bTB se asocia en ocasiones con la presencia de un reservorio salvaje que mantiene la infección (Pfeiffer, 2013); sin embargo, la ausencia de *clusters* en otras áreas de la Comunidad de Madrid donde la densidad estimada de jabalíes era similar o superior al área de alto riesgo aquí descrita (Bosch, 2012; Acevedo et al., 2014) sugirió que, al menos, éste no es el único factor involucrado en el mantenimiento de la enfermedad en la región.

El análisis espacial, en combinación con la información molecular de las cepas aisladas resultó especialmente informativo del posible patrón espacio-temporal de transmisión del patógeno. La disponibilidad de información sobre los perfiles moleculares de cepas del complejo *M. tuberculosis* aisladas del ganado durante este periodo, caracterizadas mediante espigotipado (Kamerbeek et al., 1997; Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998), permitió identificar tres perfiles mayoritarios de espigotipo (SB0339, SB0121 y SB1142), los más prevalentes a nivel nacional (Rodríguez et al., 2010), que englobaron más del 70% de las cepas presentes en la zona de alta prevalencia. La caracterización adicional de estos perfiles procedentes del área de alto riesgo con la técnica MIRU-VNTR (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998), con un mayor poder de discriminación, reveló, por un lado, la posible endemidad de un número reducido de patrones (SB0339-MV0006 y SB1142-MV0003) ampliamente distribuidos en la región y, por otro, la posible introducción en el área de alto riesgo de perfiles (SB0121-VNTR) no relacionados entre sí desde otras regiones del país. Esta hipótesis se vería reforzada por la correspondiente distribución nacional de estos tres perfiles (Duarte et al., 2008; Rodríguez et al., 2010; Rodríguez-Campos et al., 2013). También se observó una asociación entre un número mayor de patrones espigotipo-VNTR diferentes hallados en una misma explotación y su positividad durante al menos dos años en 2010-2012, lo que sugiere que la recurrencia de bTB en una explotación durante el

periodo de estudio pudo estar relacionada no solo con la persistencia de la infección, sino también con nuevas introducciones de cepas distintas de *M. bovis*.

El cálculo de los valores del coeficiente de transmisión intra-rebaño β , estimado mediante la aplicación de un modelo de transmisión SORI (Kean et al., 1999), reveló unas dinámicas en consonancia con lo obtenido previamente en la Comunidad de Madrid (Alvarez et al., 2012c) y en otras regiones (Barlow et al., 1997; Perez et al., 2002a; Fischer et al., 2005) (mediana: 4,42; rango intercuartílico: 2,62-6,29). Si bien estos valores no diferían significativamente entre brotes localizados fuera y dentro del área de alto riesgo, se observó una asociación entre determinadas variables de brote y estos β , tales como el número de reactores hallado en el primer saneamiento positivo y el historial de brotes anteriores. En este estudio, a diferencia de investigaciones anteriores (Olea-Popelka et al., 2004), un historial de brotes anteriores en una explotación se asoció a un menor coeficiente de transmisión, lo que podía explicarse por una mayor presencia de falsos negativos a la prueba de la IDTB en estas explotaciones (que daría lugar a una subestimación de β). Otras variables como la presencia de un número mayor de reactores en el primer saneamiento positivo, el uso de IFN- γ y el aislamiento de MTC de algún animal durante el brote también se asociaron con niveles más elevados de la estimación de β , reflejando el impacto esperado de estos factores en el método de estimación del coeficiente de transmisión (Alvarez et al., 2012c). El hallazgo más interesante, no obstante, fue que una vez controlado el efecto de estos factores la localización de las explotaciones tenía también una influencia significativa en sus estimaciones de β : se observó una fuerte autocorrelación de los β estimados en granjas situadas en distancias menores a 14 km sugiriendo que la intensidad de la transmisión entre granjas vecinas era similar. Esto apunta a una transmisión local de cepas de bTB (Dommergues et al., 2012), que podría ser consecuencia de los contactos entre animales de diferentes explotaciones en pastos comunales, el movimiento local de ganado, la exposición a un reservorio salvaje infectado o a otras fuentes locales no identificadas; la falta de información al respecto imposibilitó la caracterización de esta red de contactos en el área de alto

riesgo, pero la cuantificación del radio en el que las explotaciones infectadas experimentaban dinámicas similares de transmisión (14 km) podría ser de utilidad a la hora de definir zonas de riesgo alrededor de un brote en las que incrementar las medidas de vigilancia y bioseguridad.

Una vez localizadas las áreas donde la bTB continúa presente a niveles preocupantes, ha de evaluarse la sensibilidad del programa actual de erradicación para la detección temprana de las explotaciones infectadas con el fin de evitar una propagación mayor de la enfermedad. Debido a que el programa se basa en la aplicación de distintas combinaciones de pruebas diagnósticas imperfectas (IDTB, prueba de IFN- γ , inspección en matadero, cultivo post-mortem), la prevalencia aparente (proporción de animales positivos a las pruebas) puede diferir de la prevalencia real (proporción de animales infectados). Esto puede dar lugar a que explotaciones infectadas se clasifiquen incorrectamente como explotaciones oficialmente libres de tuberculosis (OTF) debido a la ausencia de reactores cuando se aplica una prueba diagnóstica de sensibilidad limitada, como es la intradermotuberculinización (IDTB) (Adams, 2001; Pollock et al., 2005; de la Rúa-Domenech et al., 2006). Con el fin de responder a cuan probable es que ocurra lo anterior, en el primer estudio del tercer capítulo de esta tesis se planteó el cálculo de la sensibilidad de rebaño del sistema diagnóstico contemplado en el programa actual de erradicación y, en concreto, en explotaciones OTF. La sensibilidad de rebaño se define como la probabilidad de observar mínimo un reactor a una prueba diagnóstica aplicada en una población verdaderamente infectada, de tamaño y prevalencia conocidos (Martin et al., 1992; Christensen and Gardner, 2000; Martin et al., 2007a). A pesar de que la fiabilidad individual de las pruebas diagnósticas de bTB ha sido extensamente evaluada en nuestro país (Gonzalez Llamazares et al., 1999; Aranaz et al., 2006b; Alvarez et al., 2012a; Alvarez et al., 2014b), apenas existe información en lo que a la sensibilidad de rebaño del programa nacional respecta. La aplicación de un árbol de escenario permitió disgregar el sistema diagnóstico establecido en explotaciones OTF en Castilla y León en sus diferentes componentes y recoger así las probabilidades que determinan los diferentes resultados posibles. Al comprobar que el modelo predecía

correctamente el número de reactores a la IDTB y de animales positivos en el análisis bacteriológico observado en explotaciones recién infectadas y detectadas (explotaciones OTF cuya calificación fue suspendida o retirada) en la región de Castilla y León en 2011-2015, se procedió a la estimación de la sensibilidad de rebaño en este escenario.

La sensibilidad de rebaño estimada para la IDTB fue moderada (mediana= 76,2%, 95% PI: 19.8 – 97.6), sugiriendo que aproximadamente tres de cada cuatro explotaciones recién infectadas se detectarían mediante la aplicación de esta prueba. Sin embargo, este valor debe interpretarse teniendo en cuenta las características la población analizada: éstas eran explotaciones OTF localizadas en un área de alta prevalencia como es Castilla y León (MAPAMA, 2017b) y, por tanto, sometidas a saneamientos cada 6-12 meses. En estas explotaciones, en el saneamiento anterior no se habían detectado reactores por lo que, o la carga de infección en el saneamiento anterior era muy baja o se infectaron en el periodo comprendido entre saneamientos. De cualquiera de las maneras, es probable que la infección estuviera presente a niveles muy bajos cuando fue detectada, como sugiere el reducido número de reactores observado en estas explotaciones (mediana= 1) y la prevalencia intra-rebaño estimada (median= 2,64%). Lo esperado en esta situación es que la mayoría de los animales infectados estuviera en fases tempranas de la infección, cuando la sensibilidad de la IDTB es limitada (Monaghan et al., 1994; Pollock et al., 2005; Alvarez et al., 2012a), explicando así la imperfecta sensibilidad de rebaño. Los resultados de la estimación del nivel de enfermedad que habría permanecido sin detectar por la IDTB por año de estudio (2011-2015) sugirieron que entre un 28% y 30,7% de las explotaciones recién infectadas no serían detectadas en un primer saneamiento, destacando la importancia del análisis rutinario de explotaciones OTF localizadas en áreas de alta prevalencia para evitar una propagación mayor de la enfermedad, ya que esta probabilidad disminuía hasta el 12,7% cuando se aplicaban dos saneamientos consecutivos. Este hecho también subraya el valor de la vigilancia pasiva a nivel de matadero, en el sacrificio rutinario de animales procedentes de explotaciones OTF, con el fin de aumentar la confianza en la libertad de enfermedad en estas explotaciones.

Por otro lado, las estimaciones del modelo sugirieron que, de entre las explotaciones recién infectadas y positivas a la IDTB, la probabilidad de confirmar la presencia de MTC a través del análisis bacteriológico de las muestras de los animales sacrificados era del 65,3% (95% PI: 50,0 – 82,3). Estos resultados subrayan la importancia de limitar el movimiento de ganado en explotaciones positivas a la IDTB incluso cuando no haya sido posible cultivar el agente causal, hasta que se evidencie la ausencia de infección en los saneamientos siguientes (ausencia de reactores a la IDTB) como exige la legislación europea [Artículos 6(1) y 14(1) de la Directiva Europea 78/52/EEC]. Esta baja proporción de explotaciones confirmadas puede explicarse por la limitada sensibilidad del cultivo en comparación con las pruebas inmunológicas de diagnóstico (Corner, 1994; Monaghan et al., 1994; Goodchild and Clifton-Hadley, 2001; Pollock and Neill, 2002; Vordermeier et al., 2004), especialmente en animales recién infectados que aún no han desarrollado lesiones, como puede observarse en reactores sacrificados en escenarios de prevalencia baja (Byrne, 1992; Tweddle and Livingstone, 1994; Goodchild and Clifton-Hadley, 2001; Anon, 2005; de la Rúa-Domenech et al., 2006). Además, incluso en presencia de éstas, la sensibilidad de la vigilancia en matadero para la detección de lesiones compatibles con tuberculosis bovina es limitada (García-Saenz et al., 2015; Pascual-Linaza et al., 2017; Willeberg et al., 2018).

Nuestro modelo estimó que una de cada cuatro explotaciones infectadas, positivas a la IDTB y negativas a cultivo en un primer saneamiento, resultaría negativa a la prueba de la IDTB en el siguiente saneamiento. Sin embargo, esta probabilidad disminuía hasta el 8,7% con un segundo saneamiento adicional, destacando la importancia de someter a estas explotaciones a dos saneamientos consecutivos (con resultados negativos a la IDTB) antes de considerarlas libres de tuberculosis bovina.

La sensibilidad de rebaño de la IDTB y de las pruebas post-mortem estuvo fuertemente correlacionada con el censo de la explotación. Este hecho no es sorprendente ya que, asumiendo una determinada prevalencia intra-rebaño, a mayor censo mayor será el número esperado de animales

infectados/positivos a las pruebas diagnósticas. Estos resultados concuerdan con los reportados por estudios previos, los cuales identificaron una asociación entre el censo de animales en una explotación y la detección de tuberculosis bovina en la misma (Skuce et al., 2012; Smith et al., 2014b). Sin embargo, no se observaron diferencias dependiendo de la aptitud, a pesar de haberse descrito con anterioridad una posible diferencia en términos de fiabilidad cuando las pruebas diagnósticas se aplican en vacuno de producción de carne vs. leche vs. lidia (Rodríguez-Prieto et al., 2012; Alvarez et al., 2014b). Aun así, nuestra población de estudio estaba principalmente compuesta por explotaciones de producción cárnica (>86%) y esto podría haber limitado la detección de diferencias entre aptitudes.

En definitiva, los resultados de este estudio sugieren que el sistema diagnóstico actual de la tuberculosis bovina basado en el cribado de las explotaciones con la prueba de la IDTB es capaz de detectar aproximadamente tres de cada cuatro explotaciones recién infectadas en un primer saneamiento (de las cuales, dos tercios se confirmarían a través del análisis bacteriológico) y, alrededor de nueve de cada diez en dos saneamientos consecutivos. Esto destaca la importancia del análisis rutinario de las explotaciones OTF y, en el caso de una explotación positiva a la IDTB, incluso cuando no haya podido cultivarse el agente causal, el requisito de someter a estas explotaciones a varios saneamientos consecutivos antes de considerarlas libres de tuberculosis bovina.

Por otra parte, la salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más prevalentes a nivel mundial (Majowicz et al., 2010a), asociada fundamentalmente al consumo de productos derivados de las aves y, en segundo lugar, del cerdo (Ballesté-Delpierre and Vila Estapé, 2016). Esta enfermedad representa una amenaza en la producción y seguridad alimentaria, añadiendo a su efecto patógeno la posible emergencia de fenotipos resistentes a antibióticos (EFSA, 2018). Según el informe de la EFSA/ECDC del año 2015 sobre zoonosis y agentes zoonóticos, la carne de cerdo y productos derivados fueron responsables del 9,3% de los brotes de salmonelosis acontecidos en Europa (European Food Safety et al., 2015),

mientras que en Estados Unidos se estima que alrededor de 100.000 casos anuales de salmonelosis humana están asociados con el consumo de esta carne (Miller et al., 2005). Teniendo en cuenta que el cerdo es una de las fuentes de proteína más consumidas a nivel mundial (Delgado, 2003), existe la necesidad de mitigar todo lo posible el riesgo asociado con su consumo. Sin embargo, *Salmonella* es un patógeno endémico en la mayor parte de explotaciones porcinas en todo el mundo, y debido a la ausencia de signos clínicos asociados con la infección (o la presencia de una sintomatología clínica leve-moderada en casos clínicos, normalmente causada por cepas del serotipo *S. Choleraesuis*) es difícil de controlar (Meldrum, 1993; Gray et al., 1995; Imberechts et al., 1998; Baloda et al., 2001; Gray and Fedorka-Cray, 2001). La presencia de portadores asintomáticos de *Salmonella* supone un riesgo adicional, ya que además de poder actuar como reservorios de la bacteria (Boyen et al., 2008) pueden alcanzar el matadero y, por tanto, contaminar la cadena alimentaria (Boyen et al., 2008; Merialdi et al., 2008). Aunque la infección/contaminación por *Salmonella* puede tener lugar en cualquier fase de la producción, su eliminación a nivel de granja puede contribuir a reducir el riesgo para la salud pública (Rostagno, 2011).

La salmonelosis porcina es una zoonosis endémica en nuestro país; aunque no existe en la actualidad un programa nacional de control, a diferencia de lo que sucede en otros países como Dinamarca (Wegener et al., 2003), si se realiza una gran inversión en estrategias para minimizar su prevalencia y el riesgo de contaminación a nivel de granja, matadero y procesamiento de los productos derivados del cerdo (Arguello et al., 2015). Como parte de estas estrategias de control de *Salmonella* en explotaciones de porcino se encuentran aquellas que mejoran la bioseguridad de las instalaciones, como el control de acceso de personal o material de explotaciones ajenas, el control de vectores, las tareas de limpieza y desinfección (Andres and Davies, 2015); también las estrategias de suplementación de la alimentación y del agua de bebida de los animales, con probióticos, prebióticos, ácidos, sales orgánicas e inorgánicas (Rasschaert et al., 2016; Tran et al., 2018); y las terapias con bacteriófagos o sueros hiper-inmunes (Zhang et al., 2015), entre otras.

La vacunación, diseñada para inducir una respuesta inmune que proteja frente a la infección, es una aproximación viable para el control de la *Salmonella* en explotaciones de porcino (Haesebrouck et al., 2004; Boyen et al., 2008). Sin embargo, su uso está limitado por la interferencia que producen muchas vacunas en el diagnóstico serológico de la enfermedad. Entre las vacunas disponibles frente a *Salmonella* se encuentran las inactivadas, cuyos resultados en animales han sido variables debido a que su capacidad de inducir una respuesta inmune celular es limitada (Xu et al., 1993; Davies and Breslin, 2003), y las atenuadas, que parecen ofrecer una buena protección debido a la inducción de una fuerte respuesta inmune celular junto con la producción de Inmunoglobulina A (Haesebrouck et al., 2004). Aunque el impacto de la vacunación en el control de *Salmonella* en esta población ha sido ampliamente evaluado, los resultados son altamente variables, probablemente debido a la heterogeneidad de vacunas y protocolos de vacunación (Wales and Davies, 2016), lo que dificulta la determinación de una estimación global del efecto esperado del uso de esta herramienta. Por ello, el segundo estudio del tercer capítulo tenía como objetivo actualizar el conocimiento existente sobre la efectividad de la vacunación frente a *Salmonella* en el porcino mediante la revisión sistemática de la literatura existente y describir la variedad de serotipos y protocolos utilizados en su aplicación para, mediante el uso de un meta-análisis de los resultados cuantitativos, determinar su eficacia global y evaluar la influencia de ciertos factores en la misma. La búsqueda de esta información en dos repertorios informatizados ampliamente utilizados en ciencias de la salud, PubMed (MEDLINE) y CAB Abstracts, confirmó el elevado número de trabajos realizados sobre este tema (con 4.375 publicaciones relacionadas con la cadena de búsqueda siendo identificadas en la primera fase) de las que, tras la revisión de sus resúmenes, se conservaron 964. En las 44 investigaciones que evaluaban la aplicación de vacunas de acuerdo a los criterios de inclusión (a lo largo de un total de 73 ensayos) se identificaron importantes diferencias en términos del tipo de vacuna (atenuada/inactivada, el serotipo *S. Typhimurium*/*S. Choleraesuis*) y la dosis, ruta y composición (uso de adyuvantes) usada en la administración, así como la medida del éxito de la vacuna. La revisión

demonstró que la medida más frecuentemente utilizada para medir la efectividad vacunal fue la comparación del porcentaje de animales cuyas muestras de heces o de tejidos fueron positivas a cultivo en el grupo vacunal vs. el control, algo esperable dado que un resultado positivo a cultivo refleja un posible riesgo de transmisión/contaminación del medio ambiente en comparación con la serología o la histología, que guardan poca relación con la probabilidad de excreción de la bacteria (Kranker et al., 2003; Straw, 2006). En algunas investigaciones (Gibson, 1999; Springer et al., 2001; Roesler et al., 2004; Takada-Iwao et al., 2013; De Ridder et al., 2014) la efectividad de la vacunación se evaluó en base a los resultados de cultivo obtenidos de muestras fecales y de tejidos, ofreciendo el primer tipo de muestra estimaciones similares o, en algunos casos superiores (Roesler et al., 2004), aunque estas diferencias nunca resultaron significativas. En el estudio aquí presente hubo preferencia por los resultados de muestras fecales, siempre que éstos estuvieran disponibles, para el análisis estadístico ya que representan mejor el riesgo que suponen los animales infectados para la salud pública (Wisener et al., 2014). Sin embargo, los resultados derivados de la evaluación de lesiones (sin aislamiento) y la mortalidad de los animales deben interpretarse con cautela ya que pueden estar sesgados por factores que afecten al bienestar de los cerdos diferentes de la infección por *Salmonella*, sobre todo en condiciones experimentales.

Gracias a la aplicación de la revisión sistemática y el meta-análisis, se identificó que la gran mayoría de las investigaciones publicadas y revisadas reportaban un efecto beneficioso de la vacunación frente a la infección por *Salmonella*, con una estimación global de su capacidad de reducción de los animales positivos a cultivo del 28,6%, aunque variable (IC 95%: 22,4 – 34,7) debido a la heterogeneidad de vacunas y protocolos. Este resultado está en gran medida en concordancia con lo reportado en revisiones realizadas con anterioridad (Denagamage et al., 2007; Wilhelm et al., 2012; Wisener et al., 2014; FAO/WHO, 2016), aunque representa una actualización del conocimiento existente en este campo ya que incluye un número superior de investigaciones revisadas en comparación con las revisiones citadas. Denagamage y colaboradores (2007) evaluaron la efectividad de la vacunación únicamente en cerdos listos

para sacrificio y concluyeron que, aunque la asociación entre la vacunación y la reducción de *Salmonella* era prometedora, no podía considerarse definitiva debido a las deficiencias en términos de diseño y comunicación de las investigaciones revisadas, y no llevaron a cabo un meta-análisis de estos resultados (Denagamage et al., 2007). Wilhelm y colaboradores (2012) compararon la efectividad de la vacunación entre estudios experimentales y estudios de campo bajo unas condiciones específicas, pero la gran heterogeneidad observada en el número limitado de estudios de campo solo permitió el cálculo de un estimador global de los experimentales (Odds Ratio: 0,3; IC 95%: 0,21-0,45) (Wilhelm et al., 2012). Wisener y colaboradores (2014) compararon los resultados de efectividad obtenidos durante y al final de los ensayos y demostraron el efecto protector de la vacunación frente a *Salmonella*, aunque éste fue menos pronunciado cuando se evaluó al final del ensayo (OR: 0,36) que en fases anteriores (OR: 0,36) (Wisener et al., 2014). El informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura también concluyó que la vacunación daba lugar a una reducción de la prevalencia de *Salmonella* en cerdos, pero con una alta heterogeneidad en este efecto (FAO/WHO, 2016). A diferencia de estas revisiones, el objetivo del estudio aquí presente fue entender también el efecto del tipo de vacuna y de la ruta de administración, entre otras, en la efectividad de esta estrategia; la falta de distinción de estas características pudo provocar la alta heterogeneidad hallada en alguna de las revisiones anteriores.

Se observó que el uso de vacunas atenuadas e inactivadas aportaban estimaciones de efectividad similares, con una diferencia de riesgo (DR) entre los animales vacunados y los controles comprendida entre el 27 y 29%, a pesar de que las vacunas atenuadas generalmente aportan una mejor protección que las inactivadas (Collins and Campbell, 1982; Linde, 1983; Robertsson et al., 1983) debido a la capacidad del agente vivo de estimular una respuesta inmune celular efectiva. Sin embargo, la mayor efectividad correspondió a la estimada cuando se administraba una combinación de ambos tipos de vacuna, con una reducción de la infección del 50,95% en los vacunados. Este aumento podría deberse al efecto “boost” de una doble vacunación en el

mismo animal. En los tres ensayos donde se identificó este protocolo de vacunación, las madres habían sido vacunadas en la octava semana de gestación y recibieron la segunda administración tres semanas después, combinando dosis de una vacuna atenuada (oralmente) y de una inactivada (intramuscularmente). Además, en uno de estos ensayos también los lechones fueron inmunizados en la segunda y quinta semana de vida. Sin embargo, la extrapolación de estos resultados está limitada por el limitado número de ensayos basados en la combinación de ambas vacunas.

La selección de un protocolo de vacunación para reducir la colonización y excreción de *Salmonella* en cerdos es complicada, además de por el tipo de vacuna (atenuada vs inactivada) como se refleja en el párrafo anterior, también por la diversidad de serotipos que pueden infectar este hospedador, ya que la inmunidad humoral es específica de serotipo mientras que la inmunidad celular, generalmente, no es serotipo-específica (Foss et al., 2013). No es sorprendente que *S. Choleraesuis* y *S. Typhimurium* fueran los serotipos más utilizados en las vacunas de las investigaciones revisadas, dado que son los serotipos más frecuentemente descritos en porcino (Foley et al., 2008). Las vacunas vivas conferirían una protección similar (DR: 25-30%) independientemente del serotipo empleado en su formulación, sugiriendo un posible mayor papel de la inmunidad celular en la respuesta a la cepa vacunal. Sin embargo, las vacunas inactivadas con *S. Choleraesuis* parecían funcionar mejor que las del serotipo *S. Typhimurium* (reducción de los animales positivos en un 73,8% vs 24,4%), lo que podría deberse a una mayor importancia de la inmunidad sistémica humoral en este caso. En todo caso estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que los dos ensayos que evaluaron las vacunas inactivadas con *S. Choleraesuis* (Draayer, 1986; Takada-Iwao et al., 2013) fueron realizados en una muestra pequeña (cinco animales en cada grupo, vacunado y control) y en cerdos desafiados experimentalmente, en comparación con los ensayos que evaluaron las vacunas inactivadas con *S. Typhimurium*, llevados a cabo en un número superior de animales (media= 915) y principalmente en condiciones de campo. De hecho, el meta-análisis reveló una mayor efectividad en las vacunas evaluadas en estudios experimentales (DR vacunas vivas: 27,5%; DR

vacunas inactivadas: 36,3%) en comparación con aquellos donde la infección era natural (DR vacunas vivas: 21,3%; DR vacunas inactivadas: 23,9%). Esta diferencia podría deberse a una exposición más homogénea y pronunciada al patógeno en los animales vacunados y controles dentro de los estudios experimentales (dosis, tiempo de exposición, etc.) en contraste con los estudios de campo, donde la presión de infección, la excreción del patógeno y la tasa de contactos es más variable (Wilhelm et al., 2012). Otra posible explicación sería la relacionada con el sesgo de publicación, ya que los estudios experimentales que reportan una efectividad mayor tienen más posibilidades de ser publicados que los estudios con resultados bajos o negativos (Borenstein, 2009).

Los resultados de este meta-análisis deben ser interpretados con precaución ya que puede existir un riesgo de sobreestimación de la precisión de las estimaciones de efectividad de la vacunación derivada de la comparación de diferentes grupos de tratamiento con el mismo grupo control, como consecuencia de la extracción de múltiples ensayos de una misma investigación que valoraba diferentes tipos de vacuna, dosis, etc. (Wisener et al., 2014). En todo caso en meta-análisis anteriores, el ratio ensayo/estudio fue de 1:2 y 1:2,5 (Wilhelm et al., 2012; Wisener et al., 2014), respectivamente, mientras que en nuestro caso la inclusión de un mayor número de investigaciones hizo que disminuyera este ratio a 1:1,7, lo que podría atenuar este riesgo.

Como todas las revisiones sistemáticas nuestro trabajo podría verse afectado por otros sesgos: aunque uno de los objetivos de este estudio fue ser más inclusivo que las revisiones publicadas con anterioridad, el hecho de que la búsqueda, por cuestiones prácticas, se llevara a cabo únicamente en repertorios informatizados limita la población de estudio a, primero, investigaciones publicadas y, segundo, a investigaciones publicadas en revistas incluidas en los dos repertorios que, como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, no son exhaustivas de todas las revistas y libros existentes (Delgado, 2010). Esto hace de nuestro estudio susceptible al sesgo de publicación, lo que podría dar lugar a conclusiones erróneas (Sutton, 2005;

Dickersin, 2006), como una sobreestimación de la efectividad de las vacunas. Por otro lado, uno de los criterios de restricción en nuestro estudio fue el idioma en el que estuviera redactada la investigación susceptible de revisarse. En este caso, los idiomas seleccionados fueron el inglés, el español y el francés. Aunque así, cuando se evaluó el posible sesgo de publicación de los ensayos incluidos en nuestro meta-análisis y, a pesar de observar que una importante proporción de los ensayos presentaba tamaños muestrales limitados y que, en aquellos de tamaño muestral mayor, la eficacia encontrada parecía ser menos pronunciada, la prueba de Macaskill no encontró evidencias indicativas de este sesgo.

Se identificaron limitaciones en lo que la calidad metodológica y de comunicación respecta en muchas de las investigaciones revisadas en nuestro estudio; la falta de información en factores de producción y manejo (censo de la explotación, densidad, manejo extensivo o intensivo, etc.) imposibilitó la evaluación de su efecto sobre la efectividad de las vacunas. Por tanto, es necesario llevar a cabo más investigaciones con el fin de determinar la importancia de estos factores, especialmente en condiciones de campo ya que únicamente el 29,5% de las investigaciones revisadas pertenecían a esta categoría, y en cerdos en la fase final de producción ya que son los que representan el mayor riesgo de contaminación de la cadena alimentaria. No obstante, nuestro trabajo resultó más inclusivo que revisiones anteriores y representa una actualización del conocimiento existente sobre la efectividad de la vacunación frente a *Salmonella* en porcino. Los resultados demuestran el efecto beneficioso, aunque variable de esta estrategia, observándose una efectividad similar en vacunas atenuadas e inactivadas, pero una influencia del serotipo, específicamente *S. Choleraesuis*, en las últimas.

8. CONCLUSIONES

1. La evaluación de la fiabilidad de la inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT) para el diagnóstico de la leishmaniosis en conejos y liebres revela valores de sensibilidad del 73% y de especificidad del 80%, lo que la convierte en una potencial herramienta de cribado en estas especies.
2. La sensibilidad de la PCR anidada para el diagnóstico de leishmaniosis en conejos y liebres es limitada (<30%), lo que cuestiona su utilización en la vigilancia de la enfermedad en lagomorfos.
3. En el diagnóstico de la tuberculosis bovina, el kit IDvet para la detección de gamma-interferón, con el punto de corte recomendado por el fabricante, ofrece una sensibilidad limitada (<37%) en un escenario epidemiológico como el de España. Una disminución del punto de corte incrementa sustancialmente la sensibilidad, manteniendo una alta especificidad.
4. La tuberculosis bovina presentó un marcado patrón espacial en forma de agrupamiento de explotaciones positivas en el norte de la Comunidad de Madrid entre 2010 a 2012. La alta homogeneidad genética de las cepas aisladas y la autocorrelación espacial de los coeficientes de transmisión estimados sugieren la existencia de factores locales que condicionan la transmisión entre granjas vecinas.
5. En Castilla y León, en explotaciones consideradas oficialmente libres de bTB (OTF) donde la prevalencia intra-rebaño es baja, la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) es capaz de detectar en un primer saneamiento tres de cada cuatro explotaciones recién infectadas. Tras dos saneamientos consecutivos en las mismas explotaciones, este número sube hasta nueve de cada diez, lo que

pone de manifiesto la importancia del análisis rutinario de explotaciones consideradas libres de enfermedad.

6. El análisis bacteriológico es capaz de confirmar la presencia de miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) en un promedio de dos de cada tres explotaciones recién infectadas y detectadas mediante la prueba de IDTB. Este resultado subraya la importancia de limitar el movimiento de ganado en explotaciones positivas a la IDTB incluso cuando no haya sido posible cultivar el agente causal.
7. Solo una de cada diez explotaciones infectadas en Castilla y León detectadas mediante IDTB, pero en las que no se aísla MTC en el primer saneamiento, no será detectada mediante la IDTB en los dos saneamientos subsiguientes, lo que resalta la importancia de someter a estas explotaciones a varios saneamientos consecutivos antes de considerarlas libres de tuberculosis bovina.
8. La información analizada en un meta-análisis indica que las vacunas frente a *Salmonella*, tanto atenuadas como inactivadas, presentan una efectividad significativa en la reducción de la prevalencia de colonización y/o excreción de la bacteria en ganado porcino.

9. CONCLUSIONS

1. The assessment of the accuracy of the Immuno-fluorescence antibody test (IFAT) for diagnosis of leishmaniasis in rabbits and hares discloses sensitivity values of 73% and specificity values of 80%, what makes the IFAT a potential screening tool in these species.
2. The sensitivity of the nested PCR for diagnosis of leishmaniasis in rabbits and hares is limited (<30%), fact that challenges its use in the surveillance of the disease in lagomorphs.
3. For diagnosis of bovine tuberculosis, the IDvet kit for detection of the interferon-gamma, at the manufacturer recommended cut-off value, presents a limited sensitivity (<37%) in an epidemiological setting as the Spanish one. A decrease in the cut-off value could substantially increase the sensitivity of the test, maintaining a high specificity.
4. Bovine tuberculosis showed a marked spatial pattern, with a cluster of positive herds located in the north of the region of Madrid between 2010 and 2012. The high genetic homogeneity of the isolated strains and the spatial autocorrelation of the estimated transmission coefficients suggest the existence of local factors that affect the transmission between neighboring herds.
5. In the region of Castilla y León, in herds considered officially tuberculosis free (OTF) with low within-herd prevalences, the intradermal tuberculin test (skin test) is able to detect in a first herd-test three out of four newly infected herds. After two consecutive herd-tests carried out in the same herds, this number rises to nine out of ten, highlighting the importance of routine testing of herds considered tuberculosis-free.

Conclusions

6. The bacteriological analysis is able to confirm the presence of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) in approximately two out of three newly infected herds detected through the skin test. This result underlines the importance of limiting cattle movement originating from skin positive herds even when the causative agent cannot be isolated.
7. Only one out of ten infected herds in Castilla y León detected through the skin test, where MTC is not isolated in the first herd-test, will not be detected through the skin test in the two subsequent herd-tests, highlighting the importance of subjecting these herds to several consecutive herd-tests before considering them tuberculosis-free.
8. The information analyzed in a meta-analysis indicates that vaccines against *Salmonella*, both attenuated and inactivated vaccines, present a significant efficacy in reducing the prevalence of colonization and/or excretion of the bacteria in swine.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, P., Quirós-Fernández, F., Casal, J., Vicente, J., 2014. Spatial distribution of wild boar population abundance: Basic information for spatial epidemiology and wildlife management. *Ecological Indicators* 36, 594-600.

Adams, L.G., 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 20, 304-324.

Adel, A., Abatih, E., Speybroeck, N., Soukehal, A., Bouguedour, R., Boughalem, K., Bouhbal, A., Djrbal, M., Saegerman, C., Berkvens, D., 2015. Estimation of Canine Leishmania Infection Prevalence in Six Cities of the Algerian Littoral Zone Using a Bayesian Approach. *PloS one* 10, e0117313.

Adkin, A., Hartnett, E., Jordan, L., Newell, D., Davison, H., 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *Journal of applied microbiology* 100, 306-315.

AFFA, 2001. Guidelines for Import Risk Analysis. Biosecurity Australia.

Agunos, A., Waddell, L., Leger, D., Taboada, E., 2014. A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. *PloS one* 9, e104905.

Ahasan, M.S., Rahman, M.S., Rahman, A.K.M.A., Berkvens, D., 2017. Bovine and Caprine Brucellosis in Bangladesh: Bayesian evaluation of four serological tests, true prevalence, and associated risk factors in household animals. *Tropical animal health and production* 49, 1-11.

Ahmed, A.M., Rizaner, A., Ulusoy, A.H., 2018. A novel decision tree classification based on post-pruning with Bayes minimum risk. *PloS one* 13, e0194168.

Alban, L., Rugbjerg, H., Petersen, J.V., Nielsen, L.R., 2016. Comparison of risk-based versus random sampling in the monitoring of antimicrobial residues in Danish finishing pigs. *Preventive veterinary medicine* 128, 87-94.

Alden, C.L., 1985. Species, sex, and tissue specificity in toxicologic and proliferative responses. *Toxicologic pathology* 13, 135-140.

Bibliografía

Alkhamis, M.M., B.R., Perez, A.M., 2015. Phylodynamics of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in Europe, 2005–2010: Potential for Molecular Surveillance of New Outbreaks. *Viruses* 7, 3310–3328.

Alvarez, J., Bezos, J., de la Cruz, M.L., Casal, C., Romero, B., Dominguez, L., de Juan, L., Perez, A., 2014a. Bovine tuberculosis: Within-herd transmission models to support and direct the decision-making process. *Research in veterinary science*.

Alvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marques, S., Grau, A., Saez, J.L., Minguez, O., de Juan, L., Dominguez, L., 2012a. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 155, 38-43.

Álvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marqués, S., Grau, A., Saez, J.L., Mínguez, O., de Juan, L., Domínguez, L., 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary microbiology* 155, 38-43.

Alvarez, J., Perez, A., Mardones, F.O., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Pagés, E., Mirat, F., Díaz, R., Carpintero, J., Domínguez, L., 2012b. Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain. *The Veterinary Journal* 194, 102-107.

Alvarez, J., Perez, A., Marques, S., Bezos, J., Grau, A., de la Cruz, M.L., Romero, B., Saez, J.L., del Rosario Esquivel, M., Martínez Mdel, C., Minguez, O., de Juan, L., Dominguez, L., 2014b. Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Vet Res* 10, 14.

Alvarez, J., Perez, A.M., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Saez-Llorente, J.L., Díaz, R., Carpintero, J., de Juan, L., Dominguez, L., 2012c. Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12 year period. *BMC Vet Res* 8, 100.

Allen, A.R., Skuce, R.A., Byrne, A.W., 2018. Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland – A Perfect Storm? The Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Controlling a Chronic Infectious Disease. *Frontiers in veterinary science* 5, 109.

Allepuz, A., Casal, J., Napp, S., Saez, M., Alba, A., Vilar, M., Domingo, M., González, M.A., Duran-Ferrer, M., Vicente, J., Álvarez, J., Muñoz, M., Saez, J.L., 2011. Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006–2009). *Preventive veterinary medicine* 100, 44-52.

Andersen, S., 1997. Re: "Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard". *American journal of epidemiology* 145, 290-291.

Andres, V.M., Davies, R.H., 2015. Biosecurity Measures to Control Salmonella and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 317-335.

Andritsos, N.D., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., 2013. Quantifying *Listeria monocytogenes* prevalence and concentration in minced pork meat and estimating performance of three culture media from presence/absence microbiological testing using a deterministic and stochastic approach. *Food Microbiology* 36, 395-405.

Andritsos, N.D., Mataragas, M., Paramithiotis, S., Nychas, G.-J.E., Drosinos, E.H., 2012. RETRACTED: Estimating the diagnostic accuracy of three culture-dependent methods for the *Listeria monocytogenes* detection from a Bayesian perspective. *International journal of food microbiology* 156, 181-185.

Anon, 2005. Annual Report for the Year Ending 30 June 2005. Animal Health Board, Wellington.

Anon, 2006. Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU Accepted by the Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force on Monitoring Animal Disease Eradication. SANCO/10200/2006.

Anzures-Cabrera, J., Higgins, J.P., 2010. Graphical displays for meta-analysis: An overview with suggestions for practice. *Research synthesis methods* 1, 66-80.

Aragon, C.L., Hofmeister, E.H., Budsberg, S.C., 2007. Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230, 514-521.

Aranaz, A., De Juan, L., Bezos, J., Alvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., Lopez-Sanchez, J., Mateos, A., Dominguez, L., 2006a. Assessment of diagnostic tools for

Bibliografía

eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research* 37, 593-606.

Aranaz, A., De Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., López-Sánchez, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006b. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research* 37, 593-606.

Aransay, A.M., Ready, P.D., Morillas-Marquez, F., 2003. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity* 90, 316.

Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., Garcia, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martinez, A.M., Perez, A.M., Aranguéz, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 18, 20546.

Arguello, H., Carvajal Urueña, A., Rubio, P., 2015. Epidemiology and control of *Salmonella* in the pork production chain: the approach in a high prevalence country (Spain).

Ashby, J., 1983. The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutation research* 115, 177-213.

Asmare, K., Sheferaw, D., Aragaw, K., Abera, M., Sibhat, B., Haile, A., Kiara, H., Szonyi, B., Skjerve, E., Wieland, B., 2016. Gastrointestinal nematode infection in small ruminants in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Acta tropica* 160, 68-77.

Atwill, E.R., Mohammed, H.O., 1996. Benefit-cost analysis of vaccination of horses as a strategy to control equine monocytic ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208, 1295-1299.

Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8, 924-937.

Bach, P.H., Bridges, J.W., 1985. A decision tree approach for the application of drug metabolism and kinetic studies to in vivo and in vitro toxicological and pharmacological

testing. Archives of toxicology. Supplement. = Archiv fur Toxikologie. Supplement 8, 173-188.

Baddeley, A., 2018. Analysing spatial point patterns in R.

Bae, J.-M., 2014. An overview of systematic reviews of diagnostic tests accuracy. Epidemiology and Health 36, e2014016.

Baloda, S.B., Christensen, L., Trajcevska, S., 2001. Persistence of a Salmonella enterica serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with Salmonella-contaminated slurry. Applied and environmental microbiology 67, 2859-2862.

Baltzell, P., Newton, H., O'Connor, A.M., 2013. A critical review and meta-analysis of the efficacy of whole-cell killed Tritrichomonas foetus vaccines in beef cattle. Journal of veterinary internal medicine 27, 760-770.

Ballesté-Delpierre, C., Vila Estapé, J., 2016. Why are we still detecting food-related *Salmonella* outbreaks in Spain? Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 34, 541-543.

Bañuls, A.-L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), Advances in Parasitology. Academic Press, 1-458.

Barlow, N.D., Kean, J.M., Hickling, G., Livingstone, P.G., Robson, A.B., 1997. A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. Preventive veterinary medicine 32, 57-75.

Basso, W., Hartnack, S., Pardini, L., Maksimov, P., Koudela, B., Venturini, M.C., Schares, G., Sidler, X., Lewis, F.I., Deplazes, P., 2013. Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of Toxoplasma gondii infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. International journal for parasitology 43, 565-570.

Batorek, N., Candek-Potokar, M., Bonneau, M., Van Milgen, J., 2012. Meta-analysis of the effect of immunocastration on production performance, reproductive organs and boar taint compounds in pigs. Animal: an international journal of animal bioscience 6, 1330-1338.

Bibliografia

Bauman, C.A., Jones-Bitton, A., Menzies, P., Toft, N., Jansen, J., Kelton, D., 2016. Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 57, 169-175.

Bedrick, E.J., Christensen, R., Johnson, W., 1997. Bayesian Binomial Regression: Predicting Survival at a Trauma Center. *The American Statistician* 51, 211-218.

Bee Wong, H., Hsiang Lim, G., 2011. Measures of Diagnostic Accuracy: Sensitivity, Specificity, PPV and NPV.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D., 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology* 165, 969-977.

Belo, V.S., Werneck, G.L., da Silva, E.S., Barbosa, D.S., Struchiner, C.J., 2015. Population Estimation Methods for Free-Ranging Dogs: A Systematic Review. *PloS one* 10, e0144830.

Benito-De Martin, M.I., Gracia-Salinas, M.J., Molina-Moreno, R., Ferrer-Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. [Influence of the nature of the ingested blood on the gonotrophic parameters of *Phlebotomus perniciosus* under laboratory conditions]. *Parasite* 1, 409-411.

Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., Lesaffre, E., 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology* 17, 145-153.

Bermingham, M.L., Handel, I.G., Glass, E.J., Woolliams, J.A., Bronsvort, B.M.d.C., McBride, S.H., Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W.J., Bishop, S.C., 2015a. Hui and Walter's latent-class model extended to estimate diagnostic test properties from surveillance data: a latent model for latent data. *Scientific reports* 5, 11861.

Bermingham, M.L., Handel, I.G., Glass, E.J., Woolliams, J.A., de Clare Bronsvort, B.M., McBride, S.H., Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W., Bishop, S.C., 2015b. Hui and Walter's latent-class model extended to estimate diagnostic test properties from surveillance data: a latent model for latent data. *Scientific reports* 5, 11861.

Berry, E.A., Hogeveen, H., Hillerton, J.E., 2004. Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies under UK conditions. *The Journal of dairy research* 71, 409-418.

Berzal, F., Cubero, J.-C., Cuenca, F., Martin-Bautista, M., 2003. On the quest for easy-to-understand splitting rules.

Bindslev-Jensen, C., Sten, E., Earl, L.K., Crevel, R.W., Bindslev-Jensen, U., Hansen, T.K., Stahl Skov, P., Poulsen, L.K., 2003. Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 41, 81-87.

Bisaillon, J.R., Feltmate, T.E., Sheffield, S., Julian, R., Todd, E., Poppe, C., Quessy, S., 2001. Classification of grossly detectable abnormalities and conditions seen at postmortem in Canadian poultry abattoirs according to a hazard identification decision tree. *Journal of food protection* 64, 1973-1980.

Blackburn, C.C., Sachs, M.B., 1989. Classification of unit types in the anteroventral cochlear nucleus: PST histograms and regularity analysis. *Journal of neurophysiology* 62, 1303-1329.

Blower, S., Bernoulli, D., 2004. An attempt at a new analysis of the mortality caused by smallpox and of the advantages of inoculation to prevent it. 1766. *Reviews in medical virology* 14, 275-288.

Boelaert, M., Criel, B., Leeuwenburg, J., Van Damme, W., Le Ray, D., Van der Stuyft, P., 2000. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 465-471.

Borenstein, M., L. V. Hedges, J. P. T. Higgins, and H. R. Rothstein, 2009. *Introduction to Meta-analysis*. John Wiley & Sons Ltd West Sussex, UK.

Bosch, A.G., von Sluys, F.J., van Nes, J.J., 1989. [Medical decision analysis in veterinary practice. An introduction with reference to the problem: to operate or not in cryptorchism in dogs]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 114, 369-375.

Bosch, J., Peris, S., Fonseca, C., Martinez, M., de la Torre, A., Iglesias, I., Muñoz, M.J., 2012. Distribution, abundance and density of the wild boar on the Iberian Peninsula, based on the CORINE program and hunting statistics. *Folia Zoologica* 61.

Boschert, K., Flecknell, P.A., Fosse, R.T., Framstad, T., Ganter, M., Sjostrand, U., Stevens, J., Thurman, J., 1996. Ketamine and its use in the pig. *Recommendations of the Consensus*

Bibliografia

meeting on Ketamine Anaesthesia in Pigs, Bergen 1994. Ketamine Consensus Working Group. *Laboratory animals* 30, 209-219.

Bouzid, M., Brainard, J., Hooper, L., Hunter, P.R., 2016. Public Health Interventions for Aedes Control in the Time of Zikavirus– A Meta-Review on Effectiveness of Vector Control Strategies. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0005176.

Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2008. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary microbiology* 130, 1-19.

Bradburn, M.J., Deeks, J.J., Berlin, J.A., Russell Localio, A., 2007. Much ado about nothing: a comparison of the performance of meta-analytical methods with rare events. *Statistics in medicine* 26, 53-77.

Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2004. Bayesian modeling of animal- and herd-level prevalences. *Preventive veterinary medicine* 66, 101-112.

Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive veterinary medicine* 68, 145-163.

Braue, E.H., Jr., 1999. Development of a reactive topical skin protectant. *Journal of applied toxicology: JAT* 19 Suppl 1, S47-53.

Breiman, L., Friedman, J., Stone, C.J., Olshen, R.A., 1984. *Classification and Regression Trees*. Wadsworth & Brooks Monterey, California, USA. 368.

Breslow, N., 1981. Odds Ratio Estimators When the Data are Sparse.

Brody, H., Rip, M.R., Vinten-Johansen, P., Paneth, N., Rachman, S., 2000. Map-making and myth-making in Broad Street: the London cholera epidemic, 1854. *Lancet* 356, 64-68.

Buczinski, S., L Ollivett, T., Dendukuri, N., 2015. Bayesian estimation of the accuracy of the calf respiratory scoring chart and ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *Preventive veterinary medicine* 119, 227-231.

Burns, M.J., O'Connor, A.M., 2008. Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: a systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. *Vaccine* 26, 144-152.

Butterworth, B.E., Conolly, R.B., Morgan, K.T., 1995. A strategy for establishing mode of action of chemical carcinogens as a guide for approaches to risk assessments. *Cancer letters* 93, 129-146.

Butterworth, B.E., Eldridge, S.R., 1995. A decision tree approach for carcinogen risk assessment. *Progress in clinical and biological research* 391, 49-70.

Byrne, A.W., Quinn, J.L., O'Keeffe, J.J., Green, S., Sleeman, D.P., Martin, S.W., Davenport, J., 2014. Large-scale movements in European badgers: has the tail of the movement kernel been underestimated? *The Journal of animal ecology* 83, 991-1001.

Byrne, D., 1992. Analysis of post-mortem data on tuberculin reactor cattle. *Irish Veterinary Journal*. 45, 131-132.

C. Bailey, T., Gatrell, T., 1995. *Interactive Spatial Data Analysis*.

Cai, C., Li, H., Edwards, J., Hawkins, C., Robertson, I.D., 2014. Meta-analysis on the efficacy of routine vaccination against foot and mouth disease (FMD) in China. *Preventive veterinary medicine* 115, 94-100.

Cannon, R.M., 2002. Demonstrating disease freedom—combining confidence levels. *Preventive veterinary medicine* 52, 227-249.

Carlin, B.P., Louis, T.A., 2009. *Bayesian Methods for Data Analysis*.

Carpenter, T.E., Berry, S.L., Glenn, J.S., 1987. Economics of *Brucella ovis* control in sheep: computerized decision-tree analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 190, 983-987.

Carpenter, T.E., Norman, B.B., 1983. An economic evaluation of metabolic and cellular profile testing in calves to be raised in a feedlot. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 72-75.

Carvalho, T.F., Haddad, J.P., Paixao, T.A., Santos, R.L., 2016. Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. *PloS one* 11, e0166582.

Casal, C., Infantes, J.A., Risalde, M.A., Diez-Guerrier, A., Dominguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Saez, J.L., Juste, R., Gortazar, C., Dominguez, L., Bezos, J., 2017. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Research in veterinary science* 112, 214-221.

Bibliografía

Castresana, J., 2002. Genes on human chromosome 19 show extreme divergence from the mouse orthologs and a high GC content. *Nucleic Acids Research* 30, 1751-1756.

CDC, 2005. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*--New York City, 2001-2004. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 54, 605-608.

Cerda Lorca, J., Valdivia, G., 2007. John Snow, la epidemia de cólera y el nacimiento de la epidemiología moderna.

Cilingir, G., Broschat, S.L., 2015. Automated Training for Algorithms That Learn from Genomic Data. *Biomed Res Int.* 2015: 234236.

Claes, F., Kuznetsov, D., Liechti, R., Von Dobschuetz, S., Dinh Truong, B., Gleizes, A., Conversa, D., Colonna, A., Demaio, E., Ramazzotto, S., Larfaoui, F., Pinto, J., Le Mercier, P., Xenarios, I., Dauphin, G., 2014. The EMPRES-i genetic module: a novel tool linking epidemiological outbreak information and genetic characteristics of influenza viruses. *Database* 2014, bau008-bau008.

Clark, P.J., Evans, F.C., 1955. On some aspects of spatial pattern in biological populations. *Science* 121, 397-398.

Clarke, M., Langhorne, P., 2001. Revisiting the Cochrane Collaboration: Meeting the challenge of Archie Cochrane—and facing up to some new ones. *BMJ: British Medical Journal* 323, 821-821.

Clegg, T.A., Duignan, A., Whelan, C., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., Toft, N., More, S.J., 2011. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary microbiology* 151, 68-76.

Clemen, R.T., Winkler, R.L., 2006. Combining Probability Distributions from Experts in Risk Analysis. *Risk Analysis* 19, 187-203.

Clements, A.C.A., Pfeiffer, D.U., Martin, V., 2006. Application of knowledge-driven spatial modelling approaches and uncertainty management to a study of Rift Valley fever in Africa. *International Journal of Health Geographics* 5, 57.

Clements, A.C.A., Pfeiffer, D.U., Otte, M.J., Morteo, K., Chen, L., 2002. A global livestock production and health atlas (GLIPHA) for interactive presentation, integration and analysis of livestock data. *Preventive veterinary medicine* 56, 19-32.

Cochrane, A.L., 1972. *Effectiveness and efficiency: Random reflections on health services*. Nuffield Trust.

Collins, F.M., Campbell, S.G., 1982. Immunity to intracellular bacteria. *Veterinary immunology and immunopathology* 3, 5-66.

Collins, J., Huynh, M., 2014. Estimation of diagnostic test accuracy without full verification: a review of latent class methods. *Statistics in medicine* 33, 4141-4169.

Collins, J.D., 2006. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Veterinary microbiology* 112, 369-381.

Collins, M.T., Morgan, I.R., 1991. Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199, 1724-1729.

Compton, C.W.R., Heuer, C., Thomsen, P.T., Carpenter, T.E., Phyn, C.V.C., McDougall, S., 2017. Invited review: A systematic literature review and meta-analysis of mortality and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 100, 1-16.

Corner, L.A., 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary microbiology* 40, 53-63.

Correa Thais, R., Assunção Renato, M., Costa Marcelo, A., 2014. A critical look at prospective surveillance using a scan statistic. *Statistics in medicine* 34, 1081-1093.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases* 4, 59-70.

Costa, M.A., Kulldorff, M., 2014. Maximum linkage space-time permutation scan statistics for disease outbreak detection. *International journal of health geographics* 13, 20.

Cousins, D.V., Roberts, J.L., 2001. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 5-15.

Bibliografia

Cowling, D.W., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 1999. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Preventive veterinary medicine* 39, 211-225.

Cramer, G.M., Ford, R.A., Hall, R.L., 1978. Estimation of toxic hazard--a decision tree approach. *Food and cosmetics toxicology* 16, 255-276.

Cripps, P.J., 2000. Veterinary education, zoonoses and public health: a personal perspective. *Acta tropica* 76, 77-80.

Cuzick, J., Edwards, R., 1990. Spatial Clustering for Inhomogeneous Populations.

Chaka, H., Thompson, P.N., Goutard, F., Grosbois, V., 2015. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays and a haemagglutination inhibition tests for the detection of antibodies to Newcastle disease virus in village chickens using a Bayesian approach. *Preventive veterinary medicine* 119, 21-30.

Chalmers, I., Dickersin, K., Chalmers, T.C., 1992. Getting to grips with Archie Cochrane's agenda. *Bmj* 305, 786-788.

Chalmers, T.C., Smith, H., Jr., Blackburn, B., Silverman, B., Schroeder, B., Reitman, D., Ambroz, A., 1981. A method for assessing the quality of a randomized control trial. *Controlled clinical trials* 2, 31-49.

Chapinal, N., Schumaker, B.A., Joly, D.O., Elkin, B.T., Stephen, C., 2015. Bayesian analysis to evaluate tests for the detection of mycobacterium bovis infection in free-ranging wild bison (*bison bison athabasca*) in the absence of a gold standard. *Journal of wildlife diseases* 51, 619-625.

Chengat Prakashbabu, B., Marshall, L.R., Crotta, M., Gilbert, W., Johnson, J.C., Alban, L., Guitian, J., 2018. Risk-based inspection as a cost-effective strategy to reduce human exposure to cysticerci of *Taenia saginata* in low-prevalence settings. *Parasites & vectors* 11, 257.

Chenoweth, S., Hughes, J., Connolly, R., 2002. Phylogeography of the pipefish, *Urocampus carinirostris*, suggests secondary intergradation of ancient lineages. *Marine Biology* 141, 541-547.

- Chouaibou, M.S., Fodjo, B.K., Fokou, G., Allassane, O.F., Koudou, B.G., David, J.-P., Antonio-Nkondjio, C., Ranson, H., Bonfoh, B., 2016. Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Côte d'Ivoire. *Malaria Journal* 15, 426.
- Christensen, J., Gardner, I.A., 2000. Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Preventive veterinary medicine* 45, 83-106.
- Chu, K.C., Cueto, C., Jr., Ward, J.M., 1981. Factors in the evaluation of 200 National Cancer Institute carcinogen bioassays. *Journal of toxicology and environmental health* 8, 251-280.
- da Silva, N., Carriquiry, A., O'Neill, K., Opriessnig, T., O'Connor, A.M., 2014. Mixed treatment comparison meta-analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines used in piglets. *Preventive veterinary medicine* 117, 413-424.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta tropica* 78, 103-116.
- Davidson, A.D., Hamilton, M.J., Boyer, A.G., Brown, J.H., Ceballos, G., 2009. Multiple ecological pathways to extinction in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10702-10705.
- Davies, R., Breslin, M., 2003. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella enteritidis* on commercial laying chicken farms. *The Veterinary record* 153, 673-677.
- Davlin, S.L., Vonville, H.M., 2012. Canine rabies vaccination and domestic dog population characteristics in the developing world: a systematic review. *Vaccine* 30, 3492-3502.
- Dawson, S., Else, R.W., Rhind, S.M., Collie, D.D., 2005. Diagnostic value of cytology of bronchoalveolar fluid for lung diseases of sheep. *The Veterinary record* 157, 433-436.
- De Kock, K.N., Wolmarans, C.T., 2005. Distribution, habitats and role as intermediate host of the freshwater snail, *Bulinus forskalii*, in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 72, 165-174.

Bibliografía

de Kock, K.N., Wolmarans, C.T., Bornman, M., 2003. Distribution and habitats of the snail *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke *Fasciola hepatica*, in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 74, 117-122.

de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 81, 190-210.

De Ridder, L., Maes, D., Dewulf, J., Butaye, P., Pasmans, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Van der Stede, Y., 2014. Use of a live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine on farrow-to-finish pig farms. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 202, 303-308.

Dean, A.S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A.E., Glaziou, P., Benyahia, A., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Gifford, G., Lubroth, J., Raviglione, M., Fujiwara, P., 2018. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases* 18, 137-138.

Deeks, J., Altman, D., 2008. *Effect Measures for Meta-Analysis of Trials with Binary Outcomes*.

Deeks, J.J., 2002. Issues in the selection of a summary statistic for meta-analysis of clinical trials with binary outcomes. *Statistics in medicine* 21, 1575-1600.

Deeks, J.J., Higgins, J. and Altman, D. G., 2008. *Analysing data and undertaking meta-analyses*. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Cochrane Book Series*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. 243-296.

Delgado, C.L., 2003. Rising Consumption of Meat and Milk in Developing Countries Has Created a New Food Revolution. *The Journal of Nutrition* 133, 3907S-3910S.

Delgado, M., 2010. *Revisión sistemática de estudios. Metaanálisis*. 3ª ed. Barcelona: Signo.

Dempster, A.P., Laird, N.M., Rubin, D.B., 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39, 1-38.

- Denagamage, T., Jayarao, B., Patterson, P., Wallner-Pendleton, E., Kariyawasam, S., 2015. Risk Factors Associated With Salmonella in Laying Hen Farms: Systematic Review of Observational Studies. *Avian diseases* 59, 291-302.
- Denagamage, T.N., O'Connor, A.M., Sargeant, J.M., Rajic, A., McKean, J.D., 2007. Efficacy of vaccination to reduce Salmonella prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne pathogens and disease* 4, 539-549.
- Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158-167.
- DerSimonian, R., Laird, N., 1986. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled clinical trials* 7, 177-188.
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., Voituron, Y., 2018. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in veterinary science* 5, 14.
- Detsky, A.S., Naylor, C.D., O'Rourke, K., McGeer, A.J., L'Abbe, K.A., 1992. Incorporating variations in the quality of individual randomized trials into meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 45, 255-265.
- Díaz-Sáez, V., Merino Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences.
- Dickersin, K., 2006. Publication Bias: Recognizing the Problem, Understanding Its Origins and Scope, and Preventing Harm.
- Doebler, P., 2015. Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy with mada.
- Doherr, M.G., Hett, A.R., Rufenacht, J., Zurbriggen, A., Heim, D., 2002. Geographical clustering of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) born in Switzerland after the feed ban. *The Veterinary record* 151, 467-472.

Bibliografia

Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. *Veterinary Epidemiologic Research*. AVC Inc., Charlottetown, 706.

Domenech, J.M., 2012. Macro IMAR for SPSS Statistics. Meta-analysis OR, RR, RD, IR, ID, B & MD Combined [Computer Program]. V2012.03.20. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

Dominguez, A., Torner, N., Ruiz, L., Martinez, A., Bartolome, R., Sulleiro, E., Teixido, A., Plasencia, A., 2007. Foodborne Salmonella-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. *Journal of food protection* 70, 209-213.

Dommergues, L., Rautureau, S., Petit, E., Dufour, B., 2012. Network of contacts between cattle herds in a French area affected by bovine tuberculosis in 2010. *Transboundary and emerging diseases* 59, 292-302.

Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Ghani, A.C., Woolhouse, M.E., Watt, C.J., Anderson, R.M., 1997. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 781-801.

Draayer, H.A., 1986. Protecting weanling pigs against salmonellosis *Veterinary medicine & small animal clinician* 81, 776-777.

Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary microbiology* 130, 415-421.

Ducrotoy, M.J., Ammary, K., Ait Lbacha, H., Zouagui, Z., Mick, V., Prevost, L., Bryssinckx, W., Welburn, S.C., Benkirane, A., 2015. Narrative overview of animal and human brucellosis in Morocco: intensification of livestock production as a driver for emergence? *Infectious diseases of poverty* 4, 57.

Ducharme, N.G., Pascoe, P.J., Lumsden, J.H., Ducharme, G.R., 1989. A computer-derived protocol to aid in selecting medical versus surgical treatment of horses with abdominal pain. *Equine veterinary journal* 21, 447-450.

Dufour, B., Pouillot, R., Toma, B., 2001. Proposed criteria to determine whether a territory is free of a given animal disease. *Veterinary research* 32, 545-563.

Dufour, S., Durocher, J., Dubuc, J., Dendukuri, N., Hassan, S., Buczinski, S., 2017. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a milk pregnancy-associated glycoprotein-based ELISA and of transrectal ultrasonographic exam for diagnosis of pregnancy at 28–45 days following breeding in dairy cows. *Preventive veterinary medicine* 140, 122-133.

Dufour, S., Frechette, A., Barkema, H.W., Mussell, A., Scholl, D.T., 2011. Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J Dairy Sci* 94, 563-579.

Dujardin, J.C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., Boelaert, M., 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging infectious diseases* 14, 1013-1018.

Dureja, H., Gupta, S., Madan, A.K., 2009. Topological models for prediction of physico-chemical, pharmacokinetic and toxicological properties of antihistaminic drugs using decision tree and moving average analysis. *International journal of computational biology and drug design* 2, 353-370.

Dwan, K., Altman, D.G., Arnaiz, J.A., Bloom, J., Chan, A.W., Cronin, E., Decullier, E., Easterbrook, P.J., Von Elm, E., Gamble, C., Gherzi, D., Ioannidis, J.P., Simes, J., Williamson, P.R., 2008. Systematic review of the empirical evidence of study publication bias and outcome reporting bias. *PloS one* 3, e3081.

Eble, P.L., de Koeijer, A.A., de Jong, M.C., Engel, B., Dekker, A., 2008. A meta-analysis quantifying transmission parameters of FMDV strain O Taiwan among non-vaccinated and vaccinated pigs. *Preventive veterinary medicine* 83, 98-106.

EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15, 5077.

EFSA, 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal* 16, e05182.

Elm, E.v., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gøtzsche, P.C., Vandenbroucke, J.P., 2007. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Bmj* 335, 806-808.

Elliott, P., Wakefield, J.C., Best, N.G., Briggs, D.J., 2000. *Spatial Epidemiology – Methods and Applications*. Oxford University Press, Oxford.

Bibliografía

Engels, E., Schmid, C., Terrin, N., Olkin, I., Lau, J., 2000. Heterogeneity and statistical significance in meta-analysis: An empirical study of 125 meta-analyses.

Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive veterinary medicine* 45, 61-81.

Erb, H.N., 1988. The benefit-cost analysis of disease control programs. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 4, 169-181.

Estrada-Gil, J.K., Fernandez-Lopez, J.C., Hernandez-Lemus, E., Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Jimenez-Sanchez, G., Vallejo-Clemente, E.E., 2007. GPDTI: a Genetic Programming Decision Tree induction method to find epistatic effects in common complex diseases. *Bioinformatics* 23, 1167-174.

European Food Safety, A., European Centre for Disease, P., Control, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, n/a-n/a.

European Food Safety, A., European Centre for Disease, P., Control, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14, e04634-n/a.

Evans, A.S., 1976. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. *The Yale journal of biology and medicine* 49, 175-195.

FAO/WHO, 2016. Interventions for the Control of Non-typhoidal Salmonella in Beef and Pork: Meeting Report and Systematic Review. . Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Microbiological Risk Assessment Series. 30, 295.

Farnsworth, M.L., Hamilton-West, C., Fitchett, S., Newman, S.H., de La Rocque, S., De Simone, L., Lubroth, J., Pinto, J., 2010. Comparing national and global data collection systems for reporting, outbreaks of H5N1 HPAl. *Preventive veterinary medicine* 95, 175-185.

Farquharson, K.A., Hogg, C.J., Grueber, C.E., 2018. A meta-analysis of birth-origin effects on reproduction in diverse captive environments. *Nature communications* 9, 1055.

Farr, W., 1866. On the cattle plague. *J. Soc. Sci* 1, 349-351.

Fasina, F.O., Meseko, A.C., Joannis, T.M., Shittu, A.I., Ularamu, H.G., Egbuji, N.A., Sulaiman, L.K., Onyekonwu, N.O., 2007. Control versus no control: options for avian influenza H5N1 in Nigeria. *Zoonoses and public health* 54, 173-176.

Feizizadeh, B., Jankowski, P., Blaschke, T., 2014. A GIS based spatially explicit sensitivity and uncertainty analysis approach for multi-criteria decision analysis (). *Computers & Geosciences* 64, 81-95.

Fenga, C., Pugliese, M., 2013. [Endemic zoonosis in Mediterranean area]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia* 35, 347-349.

Fischer, E.A., van Roermund, H.J., Hemerik, L., van Asseldonk, M.A., de Jong, M.C., 2005. Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. *Preventive veterinary medicine* 67, 283-301.

Foddai, A., Stockmarr, A., Boklund, A., 2016. Evaluation of temporal surveillance system sensitivity and freedom from bovine viral diarrhoea in Danish dairy herds using scenario tree modelling. *BMC Vet Res* 12, 118.

Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D., Höök, T.O., 2018. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment* 631-632, 550-559.

Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 86, E149-162.

Foss, D.L., Agin, T.S., Bade, D., Dearwester, D.A., Jolie, R., Keich, R.L., Lohse, R.M., Reed, M., Rosey, E.L., Schneider, P.A., Taylor, L.P., Willy, M.S., 2013. Protective immunity to *Salmonella enterica* is partially serogroup specific. *Veterinary immunology and immunopathology* 155, 76-86.

Franceschini, G., Robinson, T.P., Morteo, K., Dentale, D., Wint, W., Otte, J., 2009. The Global Livestock Impact Mapping System (GLIMS) as a tool for animal health applications. *Veterinaria italiana* 45, 491-499.

Franco, F.A., Morillas-Marquez, F., Barón, S., Morales-Yuste, M., Galvez, R., Diaz, V., Pesson, B., Alves-Pires, C., Depaquit, J., Molina, R., Afonso, M., Gallego, M., Guernaoui, S.,

Bibliografía

Bounamous, A., Martin-Sanchez, J., 2010. Genetic structure of *Phlebotomus* (Larrousius) ariasi populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: Epidemiological implications.

Freeman, K., Mistry, H., Tsertsvadze, A., Royle, P., McCarthy, N., Taylor-Phillips, S., Manuel, R., Mason, J., 2017. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: a systematic review and economic analysis. *Health technology assessment* (Winchester, England) 21, 1-188.

Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W.A., 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* (Reading, England) 144 (Pt 5), 1189-1196.

Gad, S.C., 1982. A neuromuscular screen for use in industrial toxicology. *Journal of toxicology and environmental health* 9, 691-704.

Gad, S.C., Smith, A.C., Cramp, A.L., Gavigan, F.A., Derelanko, M.J., 1984. Innovative designs and practices for acute systemic toxicity studies. *Drug and chemical toxicology* 7, 423-434.

Galbraith, R., 1988. Graphical display of estimates having differing standard errors. *Technometrics* 30, 271-281.

Galvez, R., Descalzo, M.A., Guerrero, I., Miro, G., Molina, R., 2011. Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.) 11, 799-806.

Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid Region (Central Spain).

Gallego, M., 2004. [Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis]. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics) 23, 661-676.

Gallo, V., Egger, M., McCormack, V., Farmer, P.B., Ioannidis, J.P., Kirsch-Volders, M., Matullo, G., Phillips, D.H., Schoket, B., Stromberg, U., Vermeulen, R., Wild, C., Porta, M., Vineis, P., 2012. Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology -

Molecular Epidemiology (STROBE-ME): an extension of the STROBE statement. *European journal of clinical investigation* 42, 1-16.

Garcia-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J., Allepuz, A., 2015. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). *Preventive veterinary medicine* 121, 332-337.

Gardner, I.A., 2002. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Australian veterinary journal* 80, 758-761.

Gardner, I.A., Carpenter, T.E., Leontides, L., Parsons, T.D., 1996. Financial evaluation of vaccination and testing alternatives for control of parvovirus-induced reproductive failure in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208, 863-869.

Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive veterinary medicine* 45, 107-122.

Gasparrini, A., Armstrong, B., Kenward, M.G., 2012. Multivariate meta-analysis for non-linear and other multi-parameter associations. *Statistics in medicine* 31, 3821-3839.

Gavaghan, D.J., Moore, R.A., McQuay, H.J., 2000. An evaluation of homogeneity tests in meta-analyses in pain using simulations of individual patient data. *Pain* 85, 415-424.

Gelfand, A.E., Adrian, F.M.S., 1990. Sampling-Based Approaches to Calculating Marginal Densities. *Journal of the American Statistical Association* 85, 398-409.

Gelman, A., Carlin, J.B., Stern, H.S., Rubin, D.B., 1995. *Bayesian Data Analysis*. Chapman & Hall, London. 528.

Gelman, A., Ligges, U., Sturtz, S., 2005. R2winbugs: a package for running WinBUGS from R.

Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Statistical Science* 7, 457-472.

Georgiadis Marios, P., Johnson Wesley, O., Gardner Ian, A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 52, 63-76.

Bibliografia

Gibson, K.J., Blaha, T., Frank, R.K., Charles, S.D., Trigo, E., 1999. Investigation into the capability of a *Salmonella choleraesuis* live vaccine to reduce the shedding of *Salmonella typhimurium* in swine. . Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. , 302–304.

Gilbert, M., Golding, N., Zhou, H., Wint, G.R.W., Robinson, T.P., Tatem, A.J., Lai, S., Zhou, S., Jiang, H., Guo, D., Huang, Z., Messina, J.P., Xiao, X., Linard, C., Van Boeckel, T.P., Martin, V., Bhatt, S., Gething, P.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., Yu, H., 2014. Predicting the risk of avian influenza A H7N9 infection in live-poultry markets across Asia. *Nature Communications* 5, 4116.

Gilks, W.R., Wild, P., 1992. Adaptive Rejection Sampling for Gibbs Sampling. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 41, 337-348.

Gill, C., Weisburd, D., Telep, C., Vitter, Z., Bennett, T., 2014. Community-oriented policing to reduce crime, disorder and fear and increase satisfaction and legitimacy among citizens: a systematic review.

Glass, G.V., 1977. Integrating Findings: The Meta-Analysis of Research. *Review of Research in Education* 5, 351-379.

Goetz, S.J., Steinberg, D., Betts, M.G., Holmes, R.T., Doran, P.J., Dubayah, R., Hofton, M., 2010. Lidar remote sensing variables predict breeding habitat of a Neotropical migrant bird. *Ecology* 91, 1569-1576.

Gomes, R.A., Monteiro, G.R., Assis, G.J., Busato, K.C., Ladeira, M.M., Chizzotti, M.L., 2016. Technical note: Estimating body weight and body composition of beef cattle through digital image analysis. *J Anim Sci* 94, 5414-5422.

Gomez-Barroso, D., Herrador, Z., San Martin, J.V., Gherasim, A., Aguado, M., Romero-Mate, A., Molina, L., Aparicio, P., Benito, A., 2015. Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 20, 11-20.

Gomez, T.M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Kaferstein, F.K., Stohr, K., 1997. Foodborne salmonellosis. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* 50, 81-89.

- Gonzalez Llamazares, O.R., Gutierrez Martin, C.B., Alvarez Nistal, D., de la Puente Redondo, V.A., Dominguez Rodriguez, L., Rodriguez Ferri, E.F., 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary microbiology* 70, 55-66.
- Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S., 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 23-41.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International journal for parasitology* 35, 1169-1180.
- Graunt, J., 1777. Natural and Political Observations Mentioned in a Following Index, and Made Upon the Bills of Mortality. In: Smith, D.P., Keyfitz, N. (Eds.), *Mathematical Demography: Selected Papers*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 11-20.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., 2001. Long-term survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis*. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 114, 370-374.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Ackermann, M.R., 1995. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary microbiology* 47, 43-59.
- Greenland, S., 1998. Probability Logic and Probabilistic Induction. *Epidemiology* 9, 322-332.
- Greenland, S., Robins, J.M., 1985. Estimation of a common effect parameter from sparse follow-up data. *Biometrics* 41, 55-68.
- Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine* 45, 3-22.
- Grindon, C., Combes, R., Cronin, M.T., Roberts, D.W., Garrod, J., 2006. Integrated decision-tree testing strategies for environmental toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 34, 651-664.
- Gur, I., Schneeweiss, R., 2009. Head lice treatments and school policies in the US in an era of emerging resistance: a cost-effectiveness analysis. *PharmacoEconomics* 27, 725-734.

Bibliografia

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary microbiology* 100, 255-268.

Haghi, M.M., Etemadifar, F., Fakhar, M., Teshnizi, S.H., Soosaraei, M., Shokri, A., Hajjhasani, A., Mashhadi, H., 2017. Status of babesiosis among domestic herbivores in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology research* 116, 1101-1109.

Halasa, T., Boklund, A., Cox, S., Enoe, C., 2011. Meta-analysis on the efficacy of foot-and-mouth disease emergency vaccination. *Preventive veterinary medicine* 98, 1-9.

Halley, E., 2016. An Estimate of the Degrees of the Mortality of Mankind, drawn from curious Tables of the Births and Funerals at the City of Breslaw; with an Attempt to ascertain the Price of Annuities upon Lives. *Journal of the Institute of Actuaries and Assurance Magazine* 18, 251-262.

Hamza, M., Idris, M.A., Maiyaki, M.B., Lamorde, M., Chippaux, J.P., Warrell, D.A., Kuznik, A., Habib, A.G., 2016. Cost-Effectiveness of Antivenoms for Snakebite Envenoming in 16 Countries in West Africa. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004568.

Harrell, F.E., 2001. *S-Plus Software. Regression Modeling Strategies*. Springer Series in Statistics. Springer, New York, NY. .

Hartway, C., Mills, L.S., 2012. A meta-analysis of the effects of common management actions on the nest success of North American birds. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology* 26, 657-666.

Hay, S.I., Battle, K.E., Pigott, D.M., Smith, D.L., Moyes, C.L., Bhatt, S., Brownstein, J.S., Collier, N., Myers, M.F., George, D.B., Gething, P.W., 2013. Global mapping of infectious disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368, 20120250.

Heesterbeek, J.A.P., Roberts, M.G., 2015. How mathematical epidemiology became a field of biology: a commentary on Anderson and May (1981) 'The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370, 20140307.

Hegazy, Y.M., Molina-Flores, B., Shafik, H., Ridler, A.L., Guitian, F.J., 2011. Ruminant brucellosis in Upper Egypt (2005–2008). *Preventive veterinary medicine* 101, 173-181.

- Henaux, V., Calavas, D., 2017. Evaluation of the cost-effectiveness of bovine brucellosis surveillance in a disease-free country using stochastic scenario tree modelling. *PloS one* 12, e0183037.
- Henrichon, J., Fu, K., 1969. A nonparametric partitioning procedure for pattern classification. *IEEE Transactions on Computers* 18, 614 - 624.
- Higgins, J.P., Thompson, S.G., 2002. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in medicine* 21, 1539-1558.
- Higgins, J.P.T., Green, S., 2011. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0*. The Cochrane Collaboration.
- Hlavsa, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., Crawford, J.T., Lobue, P.A., 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47, 168-175.
- Holmes, A.H., Moore, L.S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J., 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)* 387, 176-187.
- Hristovski, M., Cvetkovikj, A., Cvetkovikj, I., Violeta, D., 2010. Concept of One Health - a New Professional Imperative.
- Hsu, S.M., Chen, T.H., Wang, C.H., 2010. Efficacy of avian influenza vaccine in poultry: a meta-analysis. *Avian diseases* 54, 1197-1209.
- Huang, L., Kulldorff, M., Gregorio, D., 2007. A Spatial Scan Statistic for Survival Data. *Biometrics* 63, 109-118.
- Huang, L., Tiwari, R.C., Zou, Z., Kulldorff, M., Feuer, E.J., 2009. Weighted Normal Spatial Scan Statistic for Heterogeneous Population Data. *Journal of the American Statistical Association* 104, 886-898.
- Hueston, W.D., Yoe, C.D., 2000. Estimating the overall power of complex surveillance systems. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, Breckenridge, USA.

Bibliografía

Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167-171.

Hui, S.L., Zhou, X.H., 1998. Evaluation of diagnostic tests without gold standards. *Statistical methods in medical research* 7, 354-370.

IDvet, I.D., 2017. Insert IFNG ver 0617 ES, N° de autorización del ministerio español: 3376-RD.

Imberechts, H., De Filette, M., Wray, C., Jones, Y., Godard, C., Pohl, P., 1998. Salmonella typhimurium phage type DT104 in Belgian livestock. *The Veterinary record* 143, 424-425.

Infante-Amate, J., Soto Fernández, D., Aguilera, E., García-Ruiz, R., Guzmán, G., Cid, A., Molina, M., 2015. The Spanish Transition to Industrial Metabolism: Long-Term Material Flow Analysis (1860–2010).

Iqbal, J., Hira, P.R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Madda, P.J., Sher, A., 2002. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of clinical microbiology* 40, 475-479.

Irwin, C.K., 2010. The use of systematic reviews for decision making in animal production medicine and policy. *Graduate Theses and Dissertations*. 11465.

Isoda, N., Asano, A., Ichijo, M., Wakamori, S., Ohno, H., Sato, K., Okamoto, H., Nakao, S., Kato, H., Saito, K., Ito, N., Usui, A., Takayama, H., Sakoda, Y., 2017. Evaluation of control measures for bovine viral diarrhoea implemented in Nemuro District, Hokkaido, Japan, using a scenario tree model. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79, 1172-1181.

J. Myles, A., N. Feudale, R., Liu, Y., A. Woody, N., D. Brown, S., 2004. *An Introduction to Decision Tree Modeling*.

Jackson, M.C., 2015. Interactions among multiple invasive animals. *Ecology* 96, 2035-2041.

Jacquez, G.M., 1994. Guidelines and procedures for investigating disease clusters. *Proceedings of a Short Course, BioMedware*. University of British Columbia, Ann Arbour, MI.

Jacquez, G.M., 1996. Statistical software for the clustering of health events. *Statistics in medicine* 15, 951-952.

Jadad, A.R., Moore, R.A., Carroll, D., Jenkinson, C., Reynolds, D.J., Gavaghan, D.J., McQuay, H.J., 1996. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled clinical trials* 17, 1-12.

Jaegger, C.F., Negrao, F., Assis, D.M., Belaz, K.R.A., Angolini, C.F.F., Fernandes, A., Santos, V.G., Pimentel, A., Abanades, D.R., Giorgio, S., Eberlin, M.N., Rocha, D.F.O., 2017. MALDI MS imaging investigation of the host response to visceral leishmaniasis. *Molecular bioSystems* 13, 1946-1953.

James Press, S., 2018. *Bayesian statistics: principles, models, and applications* / S. James Press.

Jankowski, P., Fraley, G., Pebesma, E., 2014. An exploratory approach to spatial decision support.

Jebara, K.B., Cáceres, P., Berlingieri, F., Weber-Vintzel, L., 2012. Ten years' work on the World Organisation for Animal Health (OIE) Worldwide Animal Disease Notification System. *Preventive veterinary medicine* 107, 149-159.

Jensen, C.S., Ersboll, A.K., Nielsen, J.P., 2002. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Preventive veterinary medicine* 54, 265-278.

Jibat, T., Hogeveen, H., Mourits, M.C., 2015. Review on dog rabies vaccination coverage in Africa: a question of dog accessibility or cost recovery? *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0003447.

Jimenez, M., Gonzalez, E., Martin-Martin, I., Hernandez, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary parasitology* 202, 296-300.

Johnson, W., Gastwirth, J., 2000. Dual group screening.

Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., 1991. Bayesian Inference for Medical Screening Tests: Approximations Useful for the Analysis of Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 53, 427-439.

Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a "Gold Standard": The Hui-Walter Paradigm Revisited. *American journal of epidemiology* 153, 921-924.

Bibliografia

- Johnson, W.O., Pearson, L.M., 1999. Dual screening. *Biometrics* 55, 867-873.
- Jones, G., Johnson, W.O., Hanson, T.E., Christensen, R., 2010. Identifiability of models for multiple diagnostic testing in the absence of a gold standard. *Biometrics* 66, 855-863.
- Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American journal of epidemiology* 141, 263-272.
- Jung, I., Kulldorff, M., Klassen, A.C., 2007. A spatial scan statistic for ordinal data. *Statistics in medicine* 26, 1594-1607.
- Jung, I., Kulldorff, M., Richard, O.J., 2010. A spatial scan statistic for multinomial data. *Statistics in medicine* 29, 1910-1918.
- Kahn, L.H., 2006. Confronting Zoonoses, Linking Human and Veterinary Medicine. *Emerging infectious diseases* 12, 556-561.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907-914.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-1354.
- Kashangura, R., Sena, E.S., Young, T., Garner, P., 2015. Effects of MVA85A vaccine on tuberculosis challenge in animals: systematic review. *International journal of epidemiology* 44, 1970-1981.
- Katz, G., Shabtai, A., Rokach, L., Ofek, N., 2014. ConfDTree: A Statistical Method for Improving Decision Trees. *Journal of Computer Science and Technology* 29, 392-407.
- Kean, J.M., Barlow, N.D., Hickling, G.J., 1999. Evaluating potential sources of bovine tuberculosis infection in a New Zealand cattle herd. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42, 101-106.

- Kel-Margoulis, O.V., Ivanova, T.G., Wingender, E., Kel, A.E., 2002. Automatic annotation of genomic regulatory sequences by searching for composite clusters. *Pacific Symposium on Biocomputing*. Pacific Symposium on Biocomputing, 187-198.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology* 160, 1577-1579.
- Klous, G., Huss, A., Heederik, D.J.J., Coutinho, R.A., 2016. Human-livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. *One Health* 2, 65-76.
- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A., Weiss, W.P., Tricarico, J.M., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J Dairy Sci* 97, 3231-3261.
- Knox, E.G., 1989. Detection of clusters. Elliott, P. (Ed.) *Methodologies of Enquiry into Disease Clustering*. Small Area, Health Statistics Unit. London. 17-22.
- Knox, E.G., Bartlett, M.S., 1964. The Detection of Space-Time Interactions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 13, 25-30.
- Knox, G., 1963. DETECTION OF LOW INTENSITY EPIDEMICITY: APPLICATION TO CLEFT LIP AND PALATE. *British journal of preventive & social medicine* 17, 121-127.
- Kobayashi, K., 2001. Methods of statistical analysis of quantitative data obtained by toxicological bioassays using rodents in Japan: historical transition of the decision tree. *Journal of environmental biology* 22, 1-9.
- Kongsro, J., 2014. Estimation of pig weight using a Microsoft Kinect prototype imaging system.
- Kostoulas, P., 2018. PriorGen: Generates Prior Distributions for Proportions. R package version 1.1.2.
- Kostoulas, P., Nielsen, S.S., Branscum, A.J., Johnson, W.O., Dendukuri, N., Dhand, N.K., Toft, N., Gardner, I.A., 2017. STARD-BLCM: Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies that use Bayesian Latent Class Models. *Preventive veterinary medicine* 138, 37-47.

Bibliografia

Kraemer, H.C., 1992. *Evaluating Medical Tests: Objective and Quantitative Guidelines*. Sage, Beverley Hills, CA. 294.

Kranker, S., Alban, L., Boes, J., Dahl, J., 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* aerotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of clinical microbiology* 41, 2282-2288.

Kristensen, C.S., Baadsgaard, N.P., Toft, N., 2011. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Preventive veterinary medicine* 98, 250-258.

Kulldorff, M., 1997. A spatial scan statistic. *Communications in Statistics - Theory and Methods* 26, 1481-1496.

Kulldorff, M., 1998. *Statistical Methods for Spatial Epidemiology: Tests for Randomness*.

Kulldorff, M., 2009. SaTScan TM v8.0: Software for the spatial and space-time scan statistics. *Information Management Services I*.

Kulldorff, M., Heffernan, R., Hartman, J., Assunção, R., Mostashari, F., 2005. A Space-Time Permutation Scan Statistic for Disease Outbreak Detection. *PLoS medicine* 2, e59.

Kulldorff, M., Huang, L., Konty, K., 2009. A scan statistic for continuous data based on the normal probability model. *International journal of health geographics* 8, 58.

Kulldorff, M., Nagarwalla, N., 1995. Spatial disease clusters: Detection and inference. *Statistics in medicine* 14, 799-810.

Kumar, R., 2016. Evaluation of diagnostic tests. *Clinical Epidemiology and Global Health* 4, 76-79.

L Fleiss, J., 1993. *The statistical basis of meta-analysis*.

Lakhtakia, R., 2014. The Legacy of Robert Koch: Surmise, search, substantiate. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 14, e37-e41.

Lambton, S.L., Nicol, C.J., Friel, M., Main, D.C., McKinstry, J.L., Sherwin, C.M., Walton, J., Weeks, C.A., 2013. A bespoke management package can reduce levels of injurious pecking in loose-housed laying hen flocks. *The Veterinary record* 172, 423.

- Laranjo-Gonzalez, M., Devleeschauwer, B., Gabriel, S., Dorny, P., Allepuz, A., 2016. Epidemiology, impact and control of bovine cysticercosis in Europe: a systematic review. *Parasites & vectors* 9, 81.
- Larson, R.L., Step, D.L., 2012. Evidence-Based Effectiveness of Vaccination Against *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* in Feedlot Cattle for Mitigating the Incidence and Effect of Bovine Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28, 97-106.e107.
- Lawson, A., 2014. Hierarchical modeling in spatial epidemiology.
- Lee, P.M., 1989. *Bayesian Statistics: An Introduction*. Oxford University Press, New York, 294.
- Leech, F.B., 1971. A Critique of the Methods and Results of the British National Surveys of Disease in Farm Animals. II. Some General Remarks on Population Surveys of Farm Animal Disease. *British Veterinary Journal* 127, 587-592.
- Leeflang, M., Deeks, J.J., Gatsonis, C., Bossuyt, P.M.M., 2008. Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy. *Annals of internal medicine* 149, 889-897.
- Leeflang, M.M., 2014. Systematic reviews and meta-analyses of diagnostic test accuracy. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20, 105-113.
- Legatti, S.A.M., El Dib, R., Legatti, E., Botan, A.G., Camargo, S.E.A., Agarwal, A., Barretti, P., Paes, A.C., 2018. Acute kidney injury in cats and dogs: A proportional meta-analysis of case series studies. *PLoS one* 13, e0190772.
- Levy, S., 2015. Warming trend: how climate shapes *Vibrio* ecology. *Environmental health perspectives* 123, A82-89.
- Lewis, M.S., 1980. Spatial clustering in childhood leukemia. *Journal of Chronic Diseases* 33, 703-712.
- Li, B., Jiao, Y., Fu, C., Xie, B., Ma, G., Teng, G., Yao, Y., 2016. Contralateral artery enlargement predicts carotid plaque progression based on machine learning algorithm models in apoE (-/-) mice. *Biomedical engineering online* 15, 146.

Bibliografia

Ligmann-Zielinska, A., Jankowski, P., 2014. Spatially-explicit integrated uncertainty and sensitivity analysis of criteria weights in multicriteria land suitability evaluation. *Environmental Modelling and Software*. 57, 235-247.

Lijmer, J.G., Mol, B.W., Heisterkamp, S., Bossel, G.J., Prins, M.H., van der Meulen, J.H., Bossuyt, P.M., 1999. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 282, 1061-1066.

Lilienfeld, A.M., Lilienfeld, D.E., 1980. *Foundations of Epidemiology*, 2nd Edition. Oxford University Press, New York. 175 - 176.

Lima, E.P., Goulart, M.O., Rolim Neto, M.L., 2015. Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. *BMC public health* 15, 858.

Linde, K., 1983. Stable, highly immunogenic mutants of "Salmonella" with two independent, attenuating markers as potential live vaccine and their validity for "Shigella" and other bacteria. *Developments in biological standardization* 53, 15-28.

Lira, J., Moresco, K.A., Stallknecht, D.E., Swayne, D.E., Fisher, D.S., 2010. Single and combination diagnostic test efficiency and cost analysis for detection and isolation of avian influenza virus from wild bird cloacal swabs. *Avian diseases* 54, 606-612.

Lorenz, W., 1992. Histamine and antihistamines in anaesthesia and surgery: from experimental pharmacology to clinical decision making. *Agents and actions. Supplements* 36, 34-56.

Lorge, E., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Maisonneuve, C., Delongas, J.L., Claude, N., 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part IV: a strategy in genotoxicity testing in drug development: some examples. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 98, 39-42.

Lubell, Y., Hopkins, H., Whitty, C.J., Staedke, S.G., Mills, A., 2008. An interactive model for the assessment of the economic costs and benefits of different rapid diagnostic tests for malaria. *Malaria journal* 7, 21.

Lunn, D., Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., 2009. The BUGS project: Evolution, critique and future directions. *Statistics in medicine* 28, 3049-3067.

Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N., Spiegelhalter, D., 2000. WinBUGS - A Bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing* 10, 325-337.

Lutumba, P., Robays, J., Miaka, C., Kande, V., Simarro, P.P., Shaw, A.P., Dujardin, B., Boelaert, M., 2005. [The efficiency of different detection strategies of human African trypanosomiasis by *T. b. gambiense*]. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 10, 347-356.

Lladró, S., Picado, A., Ballart, C., Portús, M., Gállego, M., 2016. Management, prevention and treatment of canine leishmaniosis in north-eastern Spain: an online questionnaire-based survey in the province of Girona with special emphasis on new preventive methods (CaniLeish vaccine and domperidone). *Veterinary Record*.

Macaskill, P., Walter, S.D., Irwig, L., 2001. A comparison of methods to detect publication bias in meta-analysis. *Statistics in medicine* 20, 641-654.

Macfarlane, M., Jones, P., Goebel, C., Dufour, E., Rowland, J., Araki, D., Costabel-Farkas, M., Hewitt, N.J., Hibatallah, J., Kirst, A., McNamee, P., Schellauf, F., Scheel, J., 2009. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: skin irritation. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 54, 188-196.

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., 2017. *Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 2.0.6.

MAGRAMA, 2013. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. .

Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniosis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal* 179, 142-144.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010a. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 50, 882-889.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., for the International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness",

Bibliografía

- S., 2010b. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50, 882-889.
- Malakoff, D., 1999. Bayes offers a 'new' way to make sense of numbers. *Science* 286, 1460-1464.
- Malczewski, J., 2006. GIS-based multicriteria decision analysis: A survey of the literature.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27, 209-220.
- Mantel, N., Haenszel, W., 1959. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *Journal of the National Cancer Institute* 22, 719-748.
- MAPAMA, 2017a. Informe Final Técnico, Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina, Año 2016. SANTE/2016/ES/SI2.725989.
- MAPAMA, 2017b. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2017.
- Mardones, F., Perez, A., Sanchez, J., Alkhamis, M., Carpenter, T., 2010. Parameterization of the duration of infection stages of serotype O foot-and-mouth disease virus: an analytical review and meta-analysis with application to simulation models. *Veterinary research* 41, 45.
- Mardones, F.O., Jansen, P.A., Valdes-Donoso, P., Jarpa, M., Lyngstad, T.M., Jimenez, D., Carpenter, T.E., Perez, A.M., 2013. Within-farm spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Atlantic salmon *Salmo salar* farms in Chile. *Diseases of aquatic organisms* 106, 7-16.
- Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P., Felger, I., 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology* 41, 3147-3153.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology* 27, 123-147.

Marsh, W., 1999. The economics of animal health in farmed livestock at the herd level. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 18, 357-366.

Martin-Martin, I., Molina, R., Rohousova, I., Drahota, J., Volf, P., Jimenez, M., 2014. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Veterinary parasitology* 202, 207-216.

Martin, P.A., Cameron, A.R., Greiner, M., 2007a. Demonstrating freedom from disease using multiple complex data sources 1: a new methodology based on scenario trees. *Preventive veterinary medicine* 79, 71-97.

Martin, P.A.J., Cameron, A.R., Barford, K., Sergeant, E.S.G., Greiner, M., 2007b. Demonstrating freedom from disease using multiple complex data sources: 2: Case study—Classical swine fever in Denmark. *Preventive veterinary medicine* 79, 98-115.

Martin, S.W., Shoukri, M., Thorburn, M.A., 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Preventive veterinary medicine* 14, 33-43.

Martin, V., De Simone, L., Lubroth, J., Ceccato, P., Chevalier, V., 2007c. Perspectives on using remotely-sensed imagery in predictive veterinary epidemiology and global early warning systems. *Geospatial health* 2, 3-14.

Martin, V., Pfeiffer, D.U., Zhou, X., Xiao, X., Prosser, D.J., Guo, F., Gilbert, M., 2011. Spatial Distribution and Risk Factors of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 in China. *PLOS Pathogens* 7, e1001308.

Martinez-Gutierrez, M., Ruiz-Saenz, J., 2016. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Vet Res* 12, 78.

Martinez-López, B., Barasona, J.A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaino, J.M., Vicente, J., 2014. Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain. *Preventive veterinary medicine* 116, 268-278.

Martins-Bede, F.T., Dutra, L.V., Freitas, C.C., Guimaraes, R.J., Amaral, R.S., Drummond, S.C., Carvalho, O.S., 2010. Schistosomiasis risk mapping in the state of Minas Gerais, Brazil, using a decision tree approach, remote sensing data and sociological indicators. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 541-548.

Bibliografia

Maskery, B., Coleman, M.S., Weinberg, M., Zhou, W., Rotz, L., Klosovsky, A., Cantey, P.T., Fox, L.M., Cetron, M.S., Stauffer, W.M., 2016. Economic Analysis of the Impact of Overseas and Domestic Treatment and Screening Options for Intestinal Helminth Infection among US-Bound Refugees from Asia. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004910.

Masseroli, M., Bollea, A., Forloni, G., 1993. Quantitative morphology and shape classification of neurons by computerized image analysis. *Computer methods and programs in biomedicine* 41, 89-99.

Mayer-Schönberger, V., Cukier, K., 2014. *Big Data—A Revolution That Will Transform How We Live, Think and Work*. Mariner Books, Houghton MifflinHarcourt Boston. 272.

McDougall, S., Niethammer, J., Graham, E.M., 2018. Antimicrobial usage and risk of retreatment for mild to moderate clinical mastitis cases on dairy farms following on-farm bacterial culture and selective therapy. *New Zealand veterinary journal* 66, 98-107.

McNamee, P., Hibatallah, J., Costabel-Farkas, M., Goebel, C., Araki, D., Dufour, E., Hewitt, N.J., Jones, P., Kirst, A., Le Varlet, B., Macfarlane, M., Marrec-Fairley, M., Rowland, J., Schellauf, F., Scheel, J., 2009. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 54, 197-209.

Meldrum, K.C., 1993. Differential diagnosis of suspected swine fever. *The Veterinary record* 133, 99.

Mendoza-Blanco, J.R., Tu, X.M., Iyengar, S., 1996. Bayesian inference on prevalence using a missing-data approach with simulation-based techniques: applications to HIV screening. *Statistics in medicine* 15, 2161-2176.

Meriardi, G., Barigazzi, G., Bonilauri, P., Tittarelli, C., Bonci, M., D'inciau, M., Dottori, M., 2008. Longitudinal Study of Salmonella Infection in Italian Farrow-To-Finish Swine Herds. *Zoonoses and public health* 55, 222-226.

Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L., Fuchs, R.L., 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical reviews in food science and nutrition* 36 Suppl, S165-186.

Metchnikoff, E., 2006. *The Founders of Modern Medicine: Pasteur, Koch, Lister*. Classics of Medicine Library: Delanco.

Michalski, R.S., 1973a. AQVAL/1 - Computer Implementation of a Variable-Valued Logic System and the Application to Pattern Recognition. "Proceedings of the First International Joint Conference on Pattern Recognition", Washington D.C.

Michalski, R.S., 1973b. Discovering Classification Rules by the Variable-Valued Logic System VL1. Proc IJCAI3, Stanford, California.

Michalski, R.S., 1983. A theory and a methodology of inductive learning. . Machine learning. An artificial intelligence approach. Morgan Kaufmann., 83 - 134.

Michel, A.L., Müller, B., van Helden, P.D., 2010. Mycobacterium bovis at the animal-human interface: A problem, or not? Veterinary microbiology 140, 371-381.

Miller, G.Y., Liu, X., McNamara, P.E., Barber, D.A., 2005. Influence of Salmonella in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. Journal of food protection 68, 1788-1798.

Mohammed, H.O., Bowman, D.D., Anuar, A.K., Rahmah, N., 1994. Evaluation of strategies to reduce the risk of congenital toxoplasmosis: a decision tree analysis approach. The Journal of eukaryotic microbiology 41, 15s.

Mohammed, H.O., Loeffler, S., Shearer, J., 1990. Financial comparison of three testing strategies for detection of estrus in dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 196, 865-869.

Moher, D., Cook, D.J., Eastwood, S., Olkin, I., Rennie, D., Stroup, D.F., 1999. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-analyses. Lancet 354, 1896-1900.

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. PLoS medicine 6, e1000097.

Moher, D., Schulz, K.F., Altman, D.G., 2001. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel group randomized trials. BMC medical research methodology 1, 2-2.

Moher, D., Tetzlaff, J., Tricco, A.C., Sampson, M., Altman, D.G., 2007. Epidemiology and Reporting Characteristics of Systematic Reviews. PLoS medicine 4, e78.

Bibliografía

Molina, R., Jimenez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martin-Martin, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology* 190, 268-271.

Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test. *Veterinary microbiology* 40, 111-124.

Moran, P.A.P., 1950. Notes on Continuous Stochastic Phenomena. *Biometrika* 37, 17-23.

Moreno, I., Alvarez, J., Garcia, N., de la Fuente, S., Martinez, I., Marino, E., Torano, A., Goyache, J., Vilas, F., Dominguez, L., Dominguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Veterinary parasitology* 199, 264-267.

Morgan, J.A., Sonquist, J.N., 1964. The Detection of Interaction Effects. Survey Research Center. The University of Michigan. Ann Arbor.

Morgan, J.N., Messenger, R.C., 1973. THAID a Sequential Analysis Program for Analysis of Nominal Scale Dependent Variables. Survey Research Center, Institute for Social Research, University of Michigan. Ann Arbor. .

Morota, G., Ventura, R.V., Silva, F.F., Koyama, M., Fernando, S.C., 2018. BIG DATA ANALYTICS AND PRECISION ANIMAL AGRICULTURE SYMPOSIUM: Machine learning and data mining advance predictive big data analysis in precision animal agriculture. *J Anim Sci* 96, 1540-1550.

Mortari, A., Lorenzelli, L., 2014. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 60, 8-21.

Muir, W.W., Ueyama, Y., Noel-Morgan, J., Kilborne, A., Page, J., 2017. A Systematic Review of the Quality of IV Fluid Therapy in Veterinary Medicine. *Frontiers in veterinary science* 4, 127.

Mulrow, C.D., 1987. The medical review article: state of the science. *Annals of internal medicine* 106, 485-488.

Muller, B., Vounatsou, P., Ngandolo, B.N., Diguimbaye-Djaibe, C., Schiller, I., Marg-Haufe, B., Oesch, B., Schelling, E., Zinsstag, J., 2009. Bayesian receiver operating characteristic

estimation of multiple tests for diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. *PLoS one* 4, e8215.

Munro, I.C., Ford, R.A., Kennepohl, E., Sprenger, J.G., 1996. Correlation of structural class with no-observed-effect levels: a proposal for establishing a threshold of concern. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 34, 829-867.

Munro, I.C., Renwick, A.G., Danielewska-Nikiel, B., 2008. The Threshold of Toxicological Concern (TTC) in risk assessment. *Toxicology letters* 180, 151-156.

Murray, A.T., Grubestic, T.H., Wei, R., 2014. Spatially significant cluster detection. *Spatial Statistics* 10, 103-116.

Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock, J.M., Clements, A., Walton, E., Bryson, D.G., 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary record* 135, 134-135.

Newcomer, B.W., Cofield, L.G., Walz, P.H., Givens, M.D., 2017. Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Preventive veterinary medicine* 138, 1-8.

Newcomer, B.W., Walz, P.H., Givens, M.D., Wilson, A.E., 2015. Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: a meta-analysis. *Theriogenology* 83, 360-365.e361.

Newsom, S.W., 2006. Pioneers in infection control: John Snow, Henry Whitehead, the Broad Street pump, and the beginnings of geographical epidemiology. *The Journal of hospital infection* 64, 210-216.

Nicolas, L., Sidjanski, S., Colle, J.H., Milon, G., 2000. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infection and immunity* 68, 6561-6566.

Njeru, J., Wareth, G., Melzer, F., Henning, K., Pletz, M.W., Heller, R., Neubauer, H., 2016. Systematic review of brucellosis in Kenya: disease frequency in humans and animals and risk factors for human infection. *BMC public health* 16, 853.

Bibliografia

Noakes, T D., Borresen, J., Hew-Butler, T., Lambert, M I., Jordaan, E., 2008. Semmelweis and the aetiology of puerperal sepsis 160 years on: an historical review. *Epidemiology and Infection* 136, 1-9.

O'Hare, A., Orton, R.J., Bessell, P.R., Kao, R.R., 2014. Estimating epidemiological parameters for bovine tuberculosis in British cattle using a Bayesian partial-likelihood approach. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 281, 20140248.

O'Neill, T.J., Sargeant, J.M., Poljak, Z., 2014. A systematic review and meta-analysis of phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. *Zoonoses and public health* 61, 519-533.

O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 76 Suppl 1, 1-46.

Odiit, M., Coleman, P.G., Liu, W.C., McDermott, J.J., Fevre, E.M., Welburn, S.C., Woolhouse, M.E., 2005. Quantifying the level of under-detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness cases. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 10, 840-849.

Ojmelukwe, A.E., Prakarnkamanant, A., Rushton, J., 2016. Estimating the sensitivity of passive surveillance for HPAI H5N1 in Bayelsa state, Nigeria. *Preventive veterinary medicine* 129, 58-66.

Okeh, U.M., Ogbonna, L.N., 2013. Statistical Evaluation of Indicators of Diagnostic Test Performance. *American Journal of BioScience*. 1, 63-73.

Olea-Popelka, F.J., Flynn, O., Costello, E., McGrath, G., Collins, J.D., O'Keeffe, J., Kelton, D.F., Berke, O., Martin, S.W., 2005. Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. *Preventive veterinary medicine* 71, 57-70.

Olea-Popelka, F.J., Griffin, J.M., Collins, J.D., McGrath, G., Martin, S.W., 2003. Bovine tuberculosis in badgers in four areas in Ireland: does tuberculosis cluster? *Preventive veterinary medicine* 59, 103-111.

Olea-Popelka, F.J., White, P.W., Collins, J.D., O'Keeffe, J., Kelton, D.F., Martin, S.W., 2004. Breakdown severity during a bovine tuberculosis episode as a predictor of future herd breakdowns in Ireland. *Preventive veterinary medicine* 63, 163-172.

Openshaw, S., Charlton, M., Wymer, C., Craft, A., 1987. A Mark 1 Analysis Machine for the Automated Analysis of Point Data Sets.

Ord, J.K., Getis, A., 1995. Local Spatial Autocorrelation Statistics: Distributional Issues and an Application. *Geographical Analysis* 27, 286-306.

Otero-Abad, B., Torgerson, P.R., 2013. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2249.

Otranto, D., Paradies, P., de Caprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P., Capelli, G., 2009. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and vaccine immunology: CVI* 16, 337-343.

Oxman, A.D., Cook, D.J., Guyatt, G.H., 1994. Users' guides to the medical literature. VI. How to use an overview. Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 272, 1367-1371.

Page, M.J., Shamseer, L., Altman, D.G., Tetzlaff, J., Sampson, M., Tricco, A.C., Catalá-López, F., Li, L., Reid, E.K., Sarkis-Onofre, R., Moher, D., 2016. Epidemiology and Reporting Characteristics of Systematic Reviews of Biomedical Research: A Cross-Sectional Study. *PLoS medicine* 13, e1002028.

Palmer, M.V., 2006. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans, 2nd Edition. *Emerging infectious diseases* 12, 1306-1306.

Pariza, M.W., Johnson, E.A., 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 33, 173-186.

Pascual-Linaza, A.V., Gordon, A.W., Stringer, L.A., Menzies, F.D., 2017. Efficiency of slaughterhouse surveillance for the detection of bovine tuberculosis in cattle in Northern Ireland. *Epidemiology and infection* 145, 995-1005.

Bibliografía

Patz, J.A., Daszak, P., Tabor, G.M., Aguirre, A.A., Pearl, M., Epstein, J., Wolfe, N.D., Kilpatrick, A.M., Foutopoulos, J., Molyneux, D., Bradley, D.J., 2004. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental health perspectives* 112, 1092-1098.

Pedersen, M.H., Hansen, T.K., Sten, E., Seguro, K., Ohtsuka, T., Morita, A., Bindlev-Jensen, C., Poulsen, L.K., 2004. Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Molecular nutrition & food research* 48, 434-440.

Penninks, A.H., 1993. The evaluation of data-derived safety factors for bis (tri-n-butyltin) oxide. *Food additives and contaminants* 10, 351-361.

Perez, A., Alkhamis, M., Carlsson, U., Brito, B., Carrasco-Medanic, R., Whedbee, Z., Willeberg, P., 2011a. Global animal disease surveillance. *Spatial and spatio-temporal epidemiology* 2, 135-145.

Perez, A.M., 2015. Past, Present, and Future of Veterinary Epidemiology and Economics: One Health, Many Challenges, No Silver Bullets. *Frontiers in veterinary science* 2, 60.

Perez, A.M., Ward, M.P., Charmandarian, A., Ritacco, V., 2002a. Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 54, 361-372.

Perez, A.M., Ward, M.P., Ritacco, V., 2011b. Modelling the feasibility of bovine tuberculosis eradication in Argentina. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 30, 635-643.

Perez, A.M., Ward, M.P., Torres, P., Ritacco, V., 2002b. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventive veterinary medicine* 56, 63-74.

Pesch, R., Pehlke, H., Jerosch, K., Schroder, W., Schluter, M., 2008. Using decision trees to predict benthic communities within and near the German Exclusive Economic Zone (EEZ) of the North Sea. *Environmental monitoring and assessment* 136, 313-325.

Peters Debra, P.C., Havstad Kris, M., Cushing, J., Tweedie, C., Fuentes, O., Villanueva-Rosales, N., 2014. Harnessing the power of big data: infusing the scientific method with machine learning to transform ecology. *Ecosphere* 5, art67.

Pfeiffer, D., 2002. *Veterinary Epidemiology—An Introduction*.

Pfeiffer, D.U., 2013. Epidemiology caught in the causal web of bovine tuberculosis. *Transboundary and emerging diseases* 60 Suppl 1, 104-110.

Pfeiffer, D.U., Robinson, T.P., Stevenson, M., Stevens, K.B., Rogers, D.J., Clements, A.C.A., 2008. *Spatial Analysis in Epidemiology*. Oxford University Press, Oxford, UK. 1 - 142.

Pfeiffer, D.U., Stevens, K.B., 2015. Spatial and temporal epidemiological analysis in the Big Data era. *Preventive veterinary medicine* 122, 213-220.

Pfuhler, S., Kirst, A., Aardema, M., Banduhn, N., Goebel, C., Araki, D., Costabel-Farkas, M., Dufour, E., Fautz, R., Harvey, J., Hewitt, N.J., Hibatallah, J., Carmichael, P., Macfarlane, M., Reisinger, K., Rowland, J., Schellauf, F., Schepky, A., Scheel, J., 2010. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: genotoxicity. A COLIPA analysis. *Regulatory toxicology and pharmacology*: RTP 57, 315-324.

Pigott, D.M., Golding, N., Mylne, A., Huang, Z., Henry, A.J., Weiss, D.J., Brady, O.J., Kraemer, M.U.G., Smith, D.L., Moyes, C.L., Bhatt, S., Gething, P.W., Horby, P.W., Bogoch, I.I., Brownstein, J.S., Mekaru, S.R., Tatem, A.J., Khan, K., Hay, S.I., 2014. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *ELife* 3, e04395.

Piniór, B., Firth, C.L., Richter, V., Lebl, K., Trauffler, M., Dzieciol, M., Hutter, S.E., Burgstaller, J., Obritzhauser, W., Winter, P., Kasbohrer, A., 2017. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Preventive veterinary medicine* 137, 77-92.

Pitcher, P.M., Galligan, D.T., 1990. Decision analysis and economic evaluation of the use of the rapid milk progesterone assay for early detection of pregnancy status of cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 1586-1590.

Plummer, M., 2012. JAGS: Just Another Gibbs Sampler.

Plummer, M., 2016. rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC. R package version 4-6.

Pocock, S.J., 2007. Safety of drug-eluting stents: demystifying network meta-analysis. *Lancet* 370, 2099-2100.

Bibliografia

Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. Mycobacterium bovis Infection and Tuberculosis in Cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115-127.

Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 108, 37-43.

Poulsen, E., 1993. Case study: erythrosine. *Food additives and contaminants* 10, 315-323.

Prates Marcos, O., Kulldorff, M., Assunção Renato, M., 2014. Relative risk estimates from spatial and space-time scan statistics: are they biased? *Statistics in medicine* 33, 2634-2644.

Praud, A., Boschirolì, M.L., Meyer, L., Garin-Bastuji, B., Dufour, B., 2015. Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Epidemiology and infection* 143, 157-166.

Price, M.A., Stewart, S.R., Miller, W.C., Behets, F., Dow, W.H., Martinson, F.E., Chilongozi, D., Cohen, M.S., 2006. The cost-effectiveness of treating male trichomoniasis to avert HIV transmission in men seeking sexually transmitted disease care in Malawi. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 43, 202-209.

Pucken, V.B., Knubben-Schweizer, G., Dopfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A., Hormansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Zimmermann, P., Hartnack, S., 2017. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS one* 12, e0179847.

Quesada, A., Reginatto, G.A., Ruiz Espanol, A., Colantonio, L.D., Burrone, M.S., 2016. [Antimicrobial resistance of Salmonella spp isolated animal food for human consumption]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 33, 32-44.

Quinlan, J., 1983. Learning efficient classification procedures and their application to chess end games. *Machine learning. An artificial intelligence approach*. Morgan Kaufmann, , 463 - 482.

Rasschaert, G., Michiels, J., Tagliabue, M., Missotten, J., De Smet, S., Heyndrickx, M., 2016. Effect of Organic Acids on Salmonella Shedding and Colonization in Pigs on a Farm with High Salmonella Prevalence.

- Rat-Aspert, O., Fourichon, C., 2010. Modelling collective effectiveness of voluntary vaccination with and without incentives. *Preventive veterinary medicine* 93, 265-275.
- RCoreTeam, 2017. R: A language and environment for statistical computing. . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ready, P., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe.
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Veterinary parasitology* 142, 23-34.
- Reichel, M.P., Hill, F.I., Voges, H., 2008. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense? *New Zealand veterinary journal* 56, 60-66.
- Rezaei, N., Hedayat, M., Aghamohammadi, A., Nichols, K.E., 2011. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 1329-1341.e1322; quiz 1342-1323.
- Richter-Reichhelm, H.B., 1989. View of the regulatory use of rat liver foci data in the Federal Republic of Germany. *Toxicologic pathology* 17, 721-723.
- Rivière, J., Le Strat, Y., Dufour, B., Hendrikx, P., 2015. Sensitivity of Bovine Tuberculosis Surveillance in Wildlife in France: A Scenario Tree Approach. *PloS one* 10, e0141884.
- Rivière, J., Le Strat, Y., Hendrikx, P., Dufour, B., 2017. Cost-effectiveness evaluation of bovine tuberculosis surveillance in wildlife in France (Sylvatub system) using scenario trees. *PloS one* 12, e0183126.
- Robert, C.P., Casella, G., 1999. Monte Carlo Statistical Methods. Springer-Verlag, New York.
- Robertsson, J.A., Lindberg, A.A., Hoiseth, S., Stocker, B.A., 1983. Salmonella typhimurium infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infection and immunity* 41, 742-750.
- Rodrigues, C.A., Gardner, I.A., Carpenter, T.E., 1990. Financial analysis of pseudorabies control and eradication in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 1316-1323.

Bibliografía

- Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013. Splitting of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype by Variable-Number Tandem-Repeat Typing Reveals High Heterogeneity in an Evolving Clonal Group. *Journal of clinical microbiology* 51, 3658-3665.
- Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J.Á., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaino, 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, 148-148.
- Rodríguez-Prieto, V., Vicente-Rubiano, M., Sanchez-Matamoros, A., Rubio-Guerri, C., Melero, M., Martínez-Lopez, B., Martínez-Aviles, M., Hoinville, L., Vergne, T., Comin, A., Schauer, B., Dorea, F., Pfeiffer, D.U., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2015. Systematic review of surveillance systems and methods for early detection of exotic, new and re-emerging diseases in animal populations. *Epidemiology and infection* 143, 2018-2042.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary microbiology* 141, 89-95.
- Roesler, U., Marg, H., Schroder, I., Mauer, S., Arnold, T., Lehmann, J., Truyen, U., Hensel, A., 2004. Oral vaccination of pigs with an invasive *gyrA-cpxA-rpoB* *Salmonella* Typhimurium mutant. *Vaccine* 23, 595-603.
- Rokach, L., Maimon, O., 2015. *Data Mining with Decision Trees: Theory and Applications*. 2nd edition. Series in Machine Perception and Artificial Intelligence. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 81.
- Romero, G.A., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e584.
- Rosendal, T., Dewey, C., Friendship, R., Wootton, S., Young, B., Poljak, Z., 2016. Association between PRRSV ORF5 Genetic Distance and Differences in Space, Time, Ownership and Animal Sources among Commercial Pig Herds. *Transboundary and emerging diseases* 63, e185-193.

- Rostagno, M.H., 2011. Vaccination to reduce Salmonella prevalence in pigs. *The Veterinary record* 169, 551-552.
- Rowlingson, B.S., Diggle, P.J., 1993. Splancs: Spatial point pattern analysis code in S-plus. *Computers & Geosciences* 19, 627-655.
- Rubach, M.P., Halliday, J.E.B., Cleaveland, S., Crump, J.A., 2013. Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Current opinion in infectious diseases* 26, 404-412.
- Ruegg, P.L., Carpenter, T.E., 1989. Decision-tree analysis of treatment alternatives for left displaced abomasum. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195, 464-467.
- Rüegg, S.R., Welby, S., Yassin, H., Van der Stede, Y., Nafzger, R., Saatkamp, H., Schüpbach-Regula, G., Stärk, K.D.C., 2018. Optimising cost-effectiveness of freedom from disease surveillance—Bluetongue Virus Serotype 8 as an example. *Preventive veterinary medicine*.
- Rutten, C.J., Velthuis, A.G.J., Steeneveld, W., Hogeveen, H., 2013. Invited review: sensors to support health management on dairy farms. *J Dairy Sci* 96, 1928-1952.
- Sackett, D.L., Rosenberg, W.M., Gray, J.A., Haynes, R.B., Richardson, W.S., 1996. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *Bmj* 312, 71-72.
- Sacks, H.S., Berrier, J., Reitman, D., Ancona-Berk, V.A., Chalmers, T.C., 1987. Meta-analyses of randomized controlled trials. *The New England journal of medicine* 316, 450-455.
- Sacks, H.S., Reitman, D., Pagano, D., Kupelnick, B., 1996. Meta-analysis: an update. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 63, 216-224.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Roels, S., Vanopdenbosch, E., Thiry, E., Berkvens, D., 2004. Decision Support Tools for Clinical Diagnosis of Disease in Cows with Suspected Bovine Spongiform Encephalopathy. *Journal of clinical microbiology* 42, 172-178.
- Sales, J., 2013. Effects of pharmacological concentrations of dietary zinc oxide on growth of post-weaning pigs: a meta-analysis. *Biological trace element research* 152, 343-349.
- Sallam, M.F., Fizer, C., Pilant, A.N., Whung, P.Y., 2017. Systematic Review: Land Cover, Meteorological, and Socioeconomic Determinants of Aedes Mosquito Habitat for Risk Mapping. *International journal of environmental research and public health* 14.

Bibliografia

Sanson, R.L., Pfeiffer, D.U., Morris, R.S., 1991. Geographic information systems: their application in animal disease control. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 10, 179-195.

Sargeant, J.M., Amezcua, M.R., Rajic, A., Waddell, L., 2007. Pre-harvest interventions to reduce the shedding of *E. coli* O157 in the faeces of weaned domestic ruminants: a systematic review. *Zoonoses and public health* 54, 260-277.

Sargeant, J.M., Kelton, D.F., O'Connor, A.M., 2014. Study designs and systematic reviews of interventions: building evidence across study designs. *Zoonoses and public health* 61 Suppl 1, 10-17.

Sasaki, Y., Toyomaki, H., Sekiguchi, S., Sueyoshi, M., Makita, K., Otake, S., Perez, A., Alvarez, J., 2017. Spatial dynamics of porcine epidemic diarrhea (PED) spread in the southern Kyushu, Japan. *Preventive veterinary medicine* 144, 81-88.

Scott, A.B., Toribio, J.-A.L.M.L., Singh, M., Groves, P., Barnes, B., Glass, K., Moloney, B., Black, A., Hernandez-Jover, M., 2018. Low- and High-Pathogenic Avian Influenza H5 and H7 Spread Risk Assessment Within and Between Australian Commercial Chicken Farms. *Frontiers in veterinary science* 5, 63.

Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A.G., Korver, O., Smit, F., Walker, R., 2003. Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 41, 1625-1649.

Schmidt, R.L., Factor, R.E., 2013. Understanding sources of bias in diagnostic accuracy studies. *Archives of pathology & laboratory medicine* 137, 558-565.

Schulman, K., Lyytikäinen, T., 2018. The effect of genetic susceptibility and targeting of sampling on the sensitivity of the surveillance system and certainty-of-freedom for classical scrapie in Finland in 2008–2014. *Preventive veterinary medicine* 152, 23-31.

Schwabe, C., 1984. *Veterinary Medicine and Human Health*. . 3rd ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Schwabe, C.W., 1981. A Brief History of American Parasitology: The Veterinary Connection between Medicine and Zoology. *The Current Status and Future of Parasitology*. 21-43.

- Schwarzer, G., 2007. meta: An R package for meta-analysis. *R News* 7, 40-45.
- Schwarzer, G., R. Carpenter, J., Rücker, G., 2015. *Meta-Analysis with R*.
- Selvin, S., 1991. *Statistical Analysis of Epidemiologic Data*. Oxford University Press, New York, 108 - 139.
- Shamseer, L., Moher, D., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., Stewart, L.A., 2015. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *Bmj* 350, g7647.
- Sharifi, S., Pakdel, A., Ebrahimi, M., Reecy, J.M., Fazeli Farsani, S., Ebrahimie, E., 2018. Integration of machine learning and meta-analysis identifies the transcriptomic bio-signature of mastitis disease in cattle. *PloS one* 13, e0191227.
- Shokri, A., Fakhar, M., Teshnizi, S.H., 2017. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Acta tropica* 165, 76-89.
- Shorter, E., 1984. Ignaz Semmelweis: The etiology, concept, and prophylaxis of childbed fever. *Medical History* 28, 334-334.
- Shoudai, T., Lappe, M., Miyano, S., Shinohara, A., Okazaki, T., Arikawa, S., Uchida, T., Shimozono, S., Shinohara, T., Kuhara, S., 1995. BONSAI Garden: parallel knowledge discovery system for amino acid sequences. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 3, 359-366.
- Silva, S.V., Samagh, B.S., Morley, R.S., 1995. Risk analysis for veterinary biologicals released into the environment. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 14, 1043-1059.
- Šimundić, A.-M., 2009. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC* 19, 203-211.
- Sindato, C., Karimuribo, E.D., Pfeiffer, D.U., Mboera, L.E., Kivaria, F., Dautu, G., Bernard, B., Paweska, J.T., 2014. Spatial and temporal pattern of Rift Valley fever outbreaks in Tanzania; 1930 to 2007. *PloS one* 9, e88897.
- Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W.J., 2012. Herd-Level Risk Factors for Bovine Tuberculosis: A Literature Review. *Veterinary Medicine International* 2012, 621210.

Bibliografía

- Smith, C., Skelly, C., Kung, N., Roberts, B., Field, H., 2014a. Flying-fox species density--a spatial risk factor for Hendra virus infection in horses in eastern Australia. *PLoS one* 9, e99965.
- Smith, M., Glass, G., 1977. *Meta-Analysis of Psychotherapy Outcome Studies*.
- Smith, R.L., Tauer, L.W., Sanderson, M.W., Grohn, Y.T., 2014b. Minimum cost to control bovine tuberculosis in cow-calf herds. *Preventive veterinary medicine* 115, 18-28.
- Socias, M.E., Fernandez, A., Gil, J.F., Krolewiecki, A.J., 2014. [Soil transmitted helminthiasis in Argentina. A systematic review]. *Medicina* 74, 29-36.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portus, M., 2001. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary parasitology* 96, 265-276.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., Natale, A., 2014. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan[®], ID Screen[®] and Leishmania 96[®]), a rapid test (Speed Leish K[®]) and an in-house IFAT. *Parasites & vectors* 7, 111-111.
- Song, T.-M., Ryu, S., 2015. Big Data Analysis Framework for Healthcare and Social Sectors in Korea. *Healthc Inform Res* 21, 3-9.
- Soto Fernández, D., Infante-Amate, J., Guzmán, G., Cid, A., Aguilera, E., García-Ruiz, R., Molina, M., 2016. The social metabolism of biomass in Spain, 1900–2008: From food to feed-oriented changes in the agro-ecosystems.
- Springer, S., Lindner, T., Steinbach, G., Selbitz, H.J., 2001. Investigation of the efficacy of a genetically-stabile live Salmonella typhimurium vaccine for use in swine. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 114, 342-345.
- Staquet, M., Rozenzweig, M., Jack Lee, Y., M. Muggia, F., 1981. Methodology for the assessment of new dichotomous diagnostic tests.

Stärk, K.D.C., Horst, H.S., Kelly, L., 2000. Combining expert opinions: a comparison of different approaches. Proceedings of the Ninth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, USA.

Stegeman, J.A., Bouma, A., Elbers, A.R., Verheijden, J.H., 2000. [The leukocyte count is a valuable parameter for detecting classical swine fever]. Tijdschrift voor diergeneeskunde 125, 511-518.

Steiniger, S., Bocher, E., 2009. An Overview on Current Free and Open Source Desktop GIS Developments. International Journal of Geographical Information Science. 23, 1345-1370.

Stevens, K., Gilbert, M., Pfeiffer, D., 2013. Modeling habitat suitability for occurrence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in domestic poultry in Asia: A spatial multicriteria decision analysis approach.

Stevens, K.B., Pfeiffer, D.U., 2011. Spatial modelling of disease using data- and knowledge-driven approaches. Spatial and spatio-temporal epidemiology 2, 125-133.

Stevens, K.B., Pfeiffer, D.U., 2015. Sources of spatial animal and human health data: Casting the net wide to deal more effectively with increasingly complex disease problems. Spatial and spatio-temporal epidemiology 13, 15-29.

Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., Herzog, I., van Doorn, A., de Snoo, G.R., Rakosy, L., Ramwell, C., 2009. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe – A review. Journal of Environmental Management 91, 22-46.

Stoate, C., Boatman, N.D., Borralho, R.J., Carvalho, C.R., Snoo, G.R.d., Eden, P., 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. Journal of Environmental Management 63, 337-365.

Stoyan, D., 1986. Upton, G. and B. Fingleton: Spatial Data Analysis bei Example. Volume 1: Point Pattern and Quantitative Data. J. Wiley & Sons, Chichester/New York/Brisbane/Toronto/Singapore 1985. X, 410 S., L. 32.95. Biometrical Journal 28, 664-664.

Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'allaire, S., Taylor, D.J., 2006. Diseases of Swine, ninth ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa (USA). 751.

Bibliografia

Sturtz, S., Ligges, U., and Gelman, A., 2010. R2OpenBUGS: A Package for Running OpenBUGS from R. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/R2OpenBUGS/vignettes/R2OpenBUGS.pdf>.

Su, C.L., Gardner Ian, A., Johnson Wesley, O., 2004. Diagnostic test accuracy and prevalence inferences based on joint and sequential testing with finite population sampling. *Statistics in medicine* 23, 2237-2255.

Su, Y., Yajima, M., 2015. R2jags: Using R to Run 'JAGS'. R package version 0.5-7.

Suess, E.A., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2002. Hierarchical Bayesian model for prevalence inferences and determination of a country's status for an animal pathogen. *Preventive veterinary medicine* 55, 155-171.

Sui, M., Huang, X., Li, Y., Ma, X., Zhang, C., Li, X., Chen, Z., Feng, H., Ren, J., Wang, F., Xu, B., Duan, G., 2016. Application and Comparison of Laboratory Parameters for Forecasting Severe Hand-Foot-Mouth Disease Using Logistic Regression, Discriminant Analysis and Decision Tree. *Clinical laboratory* 62, 1023-1031.

Suk, J.E., Semenza, J.C., 2011. Future Infectious Disease Threats to Europe. *American Journal of Public Health* 101, 2068-2079.

Sun, Z., Samarasinghe, S., Jago, J., 2010. Detection of mastitis and its stage of progression by automatic milking systems using artificial neural networks. *The Journal of dairy research* 77, 168-175.

Sutton, A.J., 2005. Evidence concerning the consequences of publication and related biases. *Publication bias in meta-analysis: prevention, assessment and adjustments*. Chichester (UK): John Wiley & Sons. 175-192.

Sweeney, A.W., Beebe, N.W., Cooper, R.D., Bauer, J.T., Peterson, A.T., 2006. Environmental factors associated with distribution and range limits of malaria vector *Anopheles farauti* in Australia. *Journal of medical entomology* 43, 1068-1075.

Tadesse, G., 2016. Brucellosis Seropositivity in Animals and Humans in Ethiopia: A Meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0005006.

Takada-Iwao, A., Seki, M., Nakanishi, M., Souma, J., Okuda, S., Okuda, Y., Imai, Y., Sato, S., 2013. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination reduces PCV2 in a PCV2 and

- Salmonella enterica serovar Choleraesuis coinfection model. *Veterinary microbiology* 162, 219-223.
- Tambella, A.M., Attili, A.R., Dupré, G., Cantalamessa, A., Martin, S., Cuteri, V., Marcazzan, S., Del Fabbro, M., 2018. Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. *PLoS one* 13, e0191093.
- Tango, T., 2008. A Spatial Scan Statistic with a Restricted Likelihood Ratio. *Japanese Journal of Biometrics* 29, 75-95.
- Tango, T., Takahashi, K., 2005. A flexibly shaped spatial scan statistic for detecting clusters. *International journal of health geographics* 4, 11.
- Tango, T., Takahashi, K., 2012. A flexible spatial scan statistic with a restricted likelihood ratio for detecting disease clusters. *Statistics in medicine* 31, 4207-4218.
- Tanimura, S., Shima, M., 2011. Quantitative measurements of inequality in geographic accessibility to pediatric care in Oita Prefecture, Japan: Standardization with complete spatial randomness. *BMC Health Services Research* 11, 163-163.
- Tanner, M.A., 1996. *Tools for Statistical Inference: Methods for the Exploration of Posterior Distributions and Likelihood Functions*. 3rd Edition. Springer, New York. 207.
- Tantely, M.L., Tortosa, P., Alout, H., Berticat, C., Berthomieu, A., Rutee, A., Dehecq, J.S., Makoundou, P., Labbe, P., Pasteur, N., Weill, M., 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. *Insect biochemistry and molecular biology* 40, 317-324.
- Tatem, A.J., Huang, Z., Narib, C., Kumar, U., Kandula, D., Pindolia, D.K., Smith, D.L., Cohen, J.M., Graupe, B., Uusiku, P., Lourenço, C., 2014. Integrating rapid risk mapping and mobile phone call record data for strategic malaria elimination planning. *Malaria Journal* 13, 52.
- Taylor, D.M., Woodgate, S.L., 1997. Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of ruminant-derived protein in cattle diets. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 16, 187-198.
- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356, 983-989.

Bibliografia

Teachers, U.V.P.H., 2017. Collaborating on One Health and veterinary public health education. *The Veterinary record* 181, 691-692.

Telep, C., Weisburd, D., Gill, C., Vitter, Z., Teichman, D., 2014. Displacement of crime and diffusion of crime control benefits in large-scale geographic areas: a systematic review.

Tennant, R.W., French, J.E., Spalding, J.W., 1995. Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environmental health perspectives* 103, 942-950.

Theurer, M.E., Larson, R.L., White, B.J., 2015. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness of commercially available vaccines against bovine herpesvirus, bovine viral diarrhoea virus, bovine respiratory syncytial virus, and parainfluenza type 3 virus for mitigation of bovine respiratory disease complex in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 246, 126-142.

Thomas, A., O'Hara, B., Ligges, U., Sturtz, S., 2006. Making BUGS open.

Thomas, D.E., Elliott, E.J., 2013. Interventions for preventing diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: systematic review. *BMC public health* 13, 799.

Thompson, S.G., 1993. Controversies in meta-analysis: the case of the trials of serum cholesterol reduction. *Statistical methods in medical research* 2, 173-192.

Thursfield, M., 2007. *Veterinary Epidemiology*.

Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kirkland, D., MacGregor, J.T., Marzin, D., Ohshima, W., Schuler, M., Suzuki, H., Zeiger, E., 2007. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation research* 627, 41-58.

Tobler, W.R., 1970. A Computer Movie Simulating Urban Growth in the Detroit Region. *Economic Geography* 46, 234-240.

Todd, T.E., Tibi, O., Lin, Y., Sayers, S., Bronner, D.N., Xiang, Z., He, Y., 2013. Meta-analysis of variables affecting mouse protection efficacy of whole organism *Brucella* vaccines and vaccine candidates. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 6, S3.

- Toledo-Rodriguez, M., Goodman, P., Illic, M., Wu, C., Markram, H., 2005. Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *The Journal of physiology* 567, 401-413.
- Tomassen, F.H., de Koeijer, A., Mourits, M.C., Dekker, A., Bouma, A., Huirne, R.B., 2002. A decision-tree to optimise control measures during the early stage of a foot-and-mouth disease epidemic. *Preventive veterinary medicine* 54, 301-324.
- Tran, T.H.T., Everaert, N., Bindelle, J., 2018. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 102, 17-32.
- Turnbull, B.W., Iwano, E.J., Burnett, W.S., Howe, H.L., Clark, L.C., 1990. Monitoring for clusters of disease: application to leukemia incidence in upstate New York. *American journal of epidemiology* 132, S136-143.
- Tweddle, N.E., Livingstone, P., 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary microbiology* 40, 23-39.
- Uehlinger, F.D., Johnston, A.C., Bollinger, T.K., Waldner, C.L., 2016. Systematic review of management strategies to control chronic wasting disease in wild deer populations in North America. *BMC Veterinary Research* 12, 173.
- Uzochukwu, B.S., Obikeze, E.N., Onwujekwe, O.E., Onoka, C.A., Griffiths, U.K., 2009. Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic test, microscopy and syndromic approach in the diagnosis of malaria in Nigeria: implications for scaling-up deployment of ACT. *Malaria journal* 8, 265.
- Valenstein, P.N., 1990. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *American journal of clinical pathology* 93, 252-258.
- Validation report, I., IDvet PPD tuberculin antigens and the ID Screen® Ruminant IFN-g ELISA: A complete solution for the diagnosis of Bovine Tuberculosis. 1-24.
- van Tulder, M., Furlan, A., Bombardier, C., Bouter, L., 2003. Updated method guidelines for systematic reviews in the cochrane collaboration back review group. *Spine* 28, 1290-1299.
- van Zyl, T., 2014. Machine Learning on Geospatial Big Data.

Bibliografia

Vandenbroucke, J.P., 1988. Passive smoking and lung cancer: a publication bias? *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 296, 391-392.

Vandenbroucke, J.P., von Elm, E., Altman, D.G., Gøtzsche, P.C., Mulrow, C.D., Pocock, S.J., Poole, C., Schlesselman, J.J., Egger, M., 2014. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and elaboration. *International Journal of Surgery* 12, 1500-1524.

Vanderburg, S., Rubach, M.P., Halliday, J.E.B., Cleaveland, S., Reddy, E.A., Crump, J.A., 2014. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2787.

Varela, N.P., Dick, P., Wilson, J., 2013. Assessing the existing information on the efficacy of bovine vaccination against *Escherichia coli* O157:H7--a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses and public health* 60, 253-268.

Vatsavai, R.R., Ganguly, A., Chandola, V., Stefanidis, A., Klasky, S., Shekhar, S., 2012. Spatiotemporal data mining in the era of big spatial data: algorithms and applications. . *Proceedings of the 1st ACM SIGSPATIAL International Workshop on Analytics for Big Geospatial Data*, ACM, Redondo Beach, California, USA. , 1-10.

Veldhuis, A., Santman-Berends, I., Schauer, B., Mars, J., Waldeck, F., Staubach, C., van Schaik, G., 2017. Epidemiological performance and subsequent costs of different surveillance strategies to control bovine herpesvirus type 1 in dairy farms. *Preventive veterinary medicine* 139, 105-114.

Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.

Verhagen, A.P., de Vet, H.C.W., de Bie, R.A., Kessels, A.G.H., Boers, M., Bouter, L.M., Knipschild, P.G., 1998. The Delphi List. *Journal of Clinical Epidemiology* 51, 1235-1241.

Verschave, S.H., Rose, H., Morgan, E.R., Claerebout, E., Vercruyse, J., Charlier, J., 2016. Modelling *Cooperia oncophora*: Quantification of key parameters in the parasitic phase. *Veterinary parasitology* 223, 111-114.

Viechtbauer, W., 2010. *Conducting Meta-Analyses in R with The metafor Package*.

- Villanueva-Cabezas, J.P., Coppo, M.J.C., Durr, P.A., McVernon, J., 2017. Vaccine efficacy against Indonesian Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1: systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 35, 4859-4869.
- Vogstad, A.R., Moxley, R.A., Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., Smith, D.R., 2013. Assessment of heterogeneity of efficacy of a three-dose regimen of a type III secreted protein vaccine for reducing STEC O157 in feces of feedlot cattle. *Foodborne pathogens and disease* 10, 678-683.
- Vordermeier, M., Goodchild, A., Clifton-Hadley, R., de la Rúa, R., 2004. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *The Veterinary record* 155, 37-38.
- Vose, D., 2000. Defining distributions from expert opinion. *Risk Analysis: A Quantitative Guide*, John Wiley & Sons, Chichester, England. 263-290.
- Waggett, B.E., McGorum, B.C., Shaw, D.J., Pirie, R.S., MacIntyre, N., Wernery, U., Milne, E.M., 2010. Evaluation of synaptophysin as an immunohistochemical marker for equine grass sickness. *Journal of comparative pathology* 142, 284-290.
- Wales, A.D., Davies, R.H., 2016. Salmonella Vaccination in Pigs: A Review. *Zoonoses and public health*.
- Waltner-Toews, D., 2017. Zoonoses, One Health and complexity: wicked problems and constructive conflict. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Wang, E., Samarasinghe, S., 2005. On-line detection of mastitis in dairy herds using artificial neural networks. *Proceedings of the Modeling and Simulation Congress, MODSIM 2005, Australia*.
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000a. Analysis of time-space clustering in veterinary epidemiology. *Preventive veterinary medicine* 43, 225-237.
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000b. Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Preventive veterinary medicine* 45, 257-284.
- Ward, M.P., Patronek, G.J., Glickman, L.T., 2003. Benefits of prophylactic gastropexy for dogs at risk of gastric dilatation-volvulus. *Preventive veterinary medicine* 60, 319-329.

Bibliografia

Wegener, H.C., Hald, T., Wong, L.F., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P., Mølbak, K., 2003. Salmonella Control Programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 9, 774-780.

Weinstein, M.C., Fineberg, H.V., Elstein, A.S., Frazier, H.S., Neuhauser, D., Neutra, R.R., McNeil, B.J., 1980. *Clinical Decision Analysis*. WB. Saunders, Philadelphia. 351.

Welby, S., Schaik, G., Veldhuis, A., Brouwer-Middelesch, H., Peroz, C., Santman-Berends, I.M., Fourichon, C., Wever, P., Van der Stede, Y., 2016. Effectiveness and Cost Efficiency of Different Surveillance Components for Proving Freedom and Early Detection of Disease: Bluetongue Serotype 8 in Cattle as Case Study for Belgium, France and the Netherlands. *Transboundary and emerging diseases* 64, 1771-1781.

Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R., 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *The Veterinary record* 121, 419-420.

Whittington, R.J., Windsor, P.A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Veterinary journal* (London, England: 1997) 179, 60-69.

WHO, 2009. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. *World Health Organization technical report series*, 1-134.

WHO, E.C.o.t.C.o.t.L.W.H.O., 2010. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. *WHO technical report series*; no. 949. Geneva, 22-26 March 2010. .

WHO, F., OIE, 2017. *Roadmap for Zoonotic Tuberculosis*.

WHO/FAO, 2002. *Global and regional food consumption patterns and trends. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation*. Geneva.

Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Atkinson, M.J., 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The Veterinary record* 128, 199-203.

Wilesmith, J.W., Wells, G.A., Cranwell, M.P., Ryan, J.B., 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary record* 123, 638-644.

- Wilhelm, B., Rajic, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazil, A., Wilkins, W., McEwen, S.A., 2012. Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for Salmonella reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Preventive veterinary medicine* 107, 1-20.
- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., Lapen, D.R., 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water research* 43, 2209-2223.
- Willeberg, P., Perez, A., Thurmond, M., Ascher, M., Carpenter, T., Alkhamis, M., 2010. Visualization and analysis of the Danish 2006 highly pathogenic avian influenza virus H5N1 wild bird surveillance data by a prototype avian influenza BioPortal. *Avian diseases* 54, 433-439.
- Willeberg, P.W., McAloon, C.G., Houtsma, E., Higgins, I., Clegg, T.A., More, S.J., 2018. The Herd-Level Sensitivity of Abattoir Surveillance for Bovine Tuberculosis: Simulating the Effects of Current and Potentially Modified Meat Inspection Procedures in Irish Cattle. *Frontiers in veterinary science* 5, 82.
- Wimbish, G., Shores, J., Spiehler, V., 1991. A comparison of three computer models for prediction of dose in acute amitriptyline overdose. *Journal of forensic sciences* 36, 153-165.
- Wisener, L.V., Sargeant, J.M., O'Connor, A.M., Faires, M.C., Glass-Kaastra, S.K., 2014. The evidentiary value of challenge trials for three pre-harvest food safety topics: a systematic assessment. *Zoonoses and public health* 61, 449-476.
- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., Diamond, J., 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279-283.
- Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 147-155.
- Wu, X., Kumar, V., Ross Quinlan, J., Ghosh, J., Yang, Q., Motoda, H., McLachlan, G.J., Ng, A., Liu, B., Yu, P.S., Zhou, Z.-H., Steinbach, M., Hand, D.J., Steinberg, D., 2008. Top 10 algorithms in data mining. *Knowledge and Information Systems* 14, 1-37.

Bibliografia

- Wylie, C.E., Carbonell-Antonanzas, M., Aiassa, E., Dhollander, S., Zagmutt, F.J., Brodbelt, D.C., Solano-Gallego, L., 2014. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. *Preventive veterinary medicine* 117, 7-18.
- Xu, H.R., Hsu, H.S., Moncure, C.W., King, R.A., 1993. Correlation of antibody titres induced by vaccination with protection in mouse typhoid. *Vaccine* 11, 725-729.
- Yan, N.D., Leung, B., Keller, W., Arnott, S.E., Gunn, J.M., Raddum, G.G., 2003. Developing conceptual frameworks for the recovery of aquatic biota from acidification. *Ambio* 32, 165-169.
- Yemshanov, D., Koch Frank, H., Ben-Haim, Y., Downing, M., Sapio, F., Siltanen, M., 2013. A New Multicriteria Risk Mapping Approach Based on a Multiattribute Frontier Concept. *Risk Analysis* 33, 1694-1709.
- Yusuf, S., Peto, R., Lewis, J., Collins, R., Sleight, P., 1985. Beta Blockade During and After Myocardial Infarction: An Overview of the Randomized Trials.
- Zhang, J., Li, Z., Cao, Z., Wang, L., Li, X., Li, S., Xu, Y., 2015. Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 39.
- Zhang, Z., 2016. Decision tree modeling using R. *Annals of Translational Medicine* 4, 275.
- Ziegler, A., König Inke, R., 2013. Mining data with random forests: current options for real-world applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery* 4, 55-63.

11. ANEXOS

11.1 Estancias internacionales

- Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA.
Supervisor: Andrés Pérez
Periodo: 3 de octubre al 17 de diciembre de 2014.
- Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA.
Supervisor: Andrés Pérez
Periodo: 13 de marzo al 24 de mayo de 2015.

11.2. Participación en congresos

11.2.1. Comunicaciones orales

- Distribución espacial de la tuberculosis bovina en una región española de alta prevalencia y dinámicas de transmisión en un periodo de tres años.
M. de la Cruz, A. Pérez, J. Bezos, E. Pagés, C. Casal, J. Carpintero, B. Romero, L. Domínguez, C. Barker, R. Díaz, J. Álvarez. 2º Congreso de la SIEVPM, Buenos Aires (Argentina), 5-7 de noviembre de 2014.
- Evaluación mediante una aproximación bayesiana de la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas actualmente contempladas en el programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina

ML de la Cruz. Jornadas III VETINDOC. Facultad de Veterinaria, UCM. Junio 2017.

- Evaluación del rendimiento del programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina en la región de Castilla y León mediante la aplicación de un árbol de decisión.

de la Cruz ML., Grau A., Nácar J., Mínguez O., Pérez A., Domínguez L., de Juan L., Álvarez J. XXII Simposio Anual de AVEDILA 2017, Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio, Valladolid, España, 16-17 de noviembre de 2017.

11.2.2. Comunicaciones en póster

- Spatial distribution of bovine tuberculosis in 2010-2012 in the region of Madrid, Spain.

de la Cruz M., Perez A., Bezos J., Pages E., Casal C., Carpintero J., Romero B., Dominguez L., Barker C., Diaz R., Alvarez J. VI M. bovis Conference. Organizado por el Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, British Cattle Veterinary Association y el Department for Environment, Food & Rural Affairs. Cardiff (Gales, Reino Unido), 16-19 de junio de 2014.

- Sensitivity and Specificity of IFAT and Skin LnPcr techniques for detection of *L. infantum* in wild lagomorphs estimated using a Bayesian approach.

María Luisa de la Cruz, Andrés Pérez, Mercedes Domínguez, Inmaculada Moreno, Nerea García, Lucas Domínguez, Julio Álvarez. ISVEE 14, 3-7 November 2015. Mérida, Yucatán, México.

- Application of a scenario tree to evaluate the performance of the Official Bovine Tuberculosis Eradication Program in a specific region of Spain

M L de la Cruz, P Pozo, A Grau, J Nacar, O Minguez, A Perez, L Dominguez, L de Juan, J Alvarez. 3rd International Conference of One Medicine, One Science. April 29-May 2, 2018. Minneapolis, MN, USA.

