

DISCURSO DE INGRESO
DEL ACADÉMICO NUMERARIO
EXCMO. SR. DR.
D. LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ

Dedicatoria: A todos a los que habiéndome ayudado,
injustamente no he mencionado

Diseño, Maquetación e Impresión:
Soluciones Gráficas Chile, S.L.L.
C/. Chile, 27
Tel./Fax 91 359 57 55
28016 MADRID
info@graficaschile.es

Depósito Legal: M-39081-2011

INDICE

Discurso del Excmo. Sr. Dr. D. Lucas Domínguez Rodríguez	5
Las micobacterias como ejemplo de patógenos en la interfase hombre / animal	9
Historia de las enfermedades causadas por micobacterias	11
El género <i>Mycobacterium</i>	17
El complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
El complejo <i>Mycobacterium avium</i>	49
<i>Mycobacterium leprae</i>	71
Micobacterias de crecimiento rápido	75
Aportaciones de la veterinaria en la lucha frente a la tuberculosis	79
Conclusión	89
Bibliografía	93
Contestación del Excmo. Sr. Dr. D. Guillermo Suárez Fernández	139

Excelentísimo Señor Presidente de la Academia de Doctores
Excelentísimos Señores Académicos
Amigos
Señoras y Señores:

Deseo que las primeras palabras de este mi discurso de toma de posesión como Académico de Número de esta Docta Institución sean para agradecer a todos Uds. su magnanimidad y generosidad por haber respaldado mi candidatura de ingreso. Sin ellas a buen seguro este acto no se estaría produciendo. De una forma especial me gustaría agradecer a aquellos académicos que avalaron con sus firmas mi candidatura.

Al profesor Guillermo Suárez, mi maestro, que supo inculcarme los verdaderos principios y el valor de la carrera científica y ha marcado el camino de mi trayectoria universitaria. Siempre estuvo cuando le necesité. Al Profesor Elías Fernando Rodríguez Ferri, mi tutor, que tras su incorporación al Departamento de Microbiología de la facultad de Veterinaria de Madrid me abrió muchas de las puertas que hasta ese momento me habían sido vedadas, y cuya plaza de catedrático ocupó en este momento en la Universidad Complutense. Y finalmente a la Profesora María Cáscales, verdadero baluarte de esta insigne Institución.

En total sintonía con lo expuesto por Ortega en sus “Meditaciones del Quijote”, si cada individuo somos consecuencia de nuestro yo y de nuestras realidades circunstanciales, en el caso de mis méritos mi aportación personal

ha sido muy pequeña. He tenido la fortuna de que incluso desde antes de mi concepción el entorno que la vida me tenía reservado fuera envidiable.

Me he permitido, por tanto, hacer una pequeña sinopsis en orden histórico de esas realidades circunstanciales. Creo que es de justicia, dado que a ellas debo todo cuanto soy. En primer lugar mi familia: mis abuelos, agricultores, ganaderos e industriales de la alimentación, de cuyo entorno me impregné en los primeros años y durante las vacaciones de verano en Cabezuela del Valle. Mi padre, la mejor persona que he conocido, a quien nunca olvidaré y por tanto hoy presente en esta sala conmigo. Mi madre, que renunció a su vida profesional para dedicarse a sus hijos, creando el entorno adecuado para su educación. Mis hermanas, con las que nunca pasé todo el tiempo que quise y con las que todavía continúo colaborando científicamente. Mis tíos, en especial mi tío Clemente, médico rural, pero para mí el mejor científico que he conocido, cerebro renacentista con el que pasé infinitas horas aprendiendo desde cómo erradicar la malaria hasta a hacer televisiones en color en la España de blanco y negro. Mi tío Segundo, para mí el Llanero Solitario. Mis primos, todos en general pero Chema y Javi en particular, que siempre fueron un estímulo para mí. Mis amigos de la infancia, Pepe, Alejandro, Justi, nunca se olvidan. Las lecturas, en especial la biografía de Pasteur que leí siendo un niño, el microscopio que mis padres me regalaron aquellos Reyes Magos. Mis maestros de la escuela, los profesores y compañeros de los Escolapios de Salamanca. Javi, Leopoldo, Michel, Angel (incluso los peores momentos los recuerdo como anécdotas interesantes). Mis Profesores y amigos de Facultad, de Salamanca y de Madrid; todos ellos en distinta medida significaron mucho para mí. No puedo olvidar la ayuda del Profesor Sanz Sánchez ni el impacto que causó en mí, recién llegado a Madrid, la asignatura de Biotecnología del Profesor Sanz Pérez. El profesor Gastón de Uriarte, que me abrió las puertas del Departamento de Microbiología sin pedir ni exigir nunca nada. Alberto Mamolar, mi gran amigo y confidente, cuantas horas y cuantas aventuras, Alberto. Los compañeros de ese Departamento de Microbiología: Cleto, que dirigió nuestro primer trabajillo de investigación cuando todavía estábamos en el tercer curso de la licenciatura y nos ofertó nuestros primeros trabajos profesionales, imborrables. Félix, con aquellos interminables cigarrillos que nos fumábamos con Alberto a las 11 de la noche, cuando nosotros salíamos del laboratorio y él entraba a trabajar. M^a Jesús, Julio y Jaime. El Profesor Suárez, que siempre respetó mis opiniones aunque supiera que estaban equivocadas; a él le debo casi todo lo que soy profesionalmente. El Profesor Rodríguez-Ferri, Esperanza, Jose Luís, Maite, Santiago y Ricardo. El servicio militar, me alegro haberlo realizado. Durante ese tiempo viví la transición española. Aprendí y supe entender realmente lo que era la España de aquel momento.

Enrique Gómez Mampaso, me abrió las puertas, primero de la listeriosis y luego de la tuberculosis. Gracias Enrique por lo mucho que me enseñaste, todavía sigo citando alguna de tus frases. Los compañeros del Departamento de Sanidad Animal y de la Facultad, Jose María, me has ayudado más de lo que crees. Los equipos de Gobierno de la Universidad en los que casi siempre encontré apoyo. Isabel Mínguez-Tudela, por desgracia prematuramente fallecida; ella nos abrió las puertas de Europa y sin sus consejos y ayuda jamás habiéramos alcanzado nuestra posición científica. Gracias Isabel. Siempre notaremos tu ausencia. Ginés, gran amigo, compañero de clínica con Alberto, crisol donde se ha fundido toda la sabiduría popular de Sancho. Rogelio, encierra en su cabeza toda la sabiduría de Galicia, que es mucha. La familia de mi mujer, también mi familia. Mis compañeros de la última aventura del grupo de Vigilancia Sanitaria; a todos ellos les agradezco su esfuerzo y dedicación, de todos he aprendido y a todos muchas gracias, pero no puedo dejar de mencionar a Joaquín, además gran amigo. Gracias Decano. Ana, compañera y soporte del viaje de estos años. Victor, Jose, Miguel Ángel, Anabel, Bruno, Jose Manuel, Luis... Alicia, que rompió la brecha de las micobacterias en nuestra Facultad junto a Ernesto. Tarea muy difícil, se partió de la nada. La nueva hornada de doctores y doctorandos: Lucía, directora del Laboratorio de Referencia Europeo; Julio, Javier, Sergio, sin vosotros este discurso hubiera sido imposible ¿verdad? Concha, ayuda infatigable. Beatriz, Sabrina, Carlos. Os pido perdón por exigirlos a veces más de lo posible. Y muchas gracias por hacer lo imposible. Sois muy buenos, tenéis un gran futuro.

No puedo dejar de mencionar a aquellos responsables de administraciones y empresas que apoyaron y siguen apoyando económicamente los proyectos, a veces sin estar muy convencidos, y que han sido soporte fundamental de los mismos. Como no agradecer la ayuda inicial, cuando no eres nadie, de Ismael, Ignacio y Felipe, hoy insigne Presidente de nuestro Colegio. Y los que no permitieron que el proyecto muriera y lo engrandecieron: Quintiliano, Carlos, Cuenca, Arnaldo, Lucio, Jose Luis, Beatriz, Juanjo, Isabel, Jesús, Rosa, Olga. Álvaro, compañero de venturas y desventuras, con Rogelio y él aprendí que la piscicultura existía, Carlos, Jose Luís... No es retórica, todo lo que se ha hecho en la Universidad Complutense en Vigilancia Sanitaria ha sido gracias a vosotros.

He querido dejar para el final, con toda intención, a las personas que han llenado mi vida el último cuarto de siglo y con los que tengo contraída la más fuerte de las deudas. Mi mujer, Coquelo, la persona con la que he compartido todo desde que la conocí, ejemplo de renuncia y sacrificio y sin cuya abnegación y dedicación hubieran sido imposibles las metas conseguidas. Mis hijos,

Lucas, Ana María, Cristina María y Teresa María, a los que ya hace tiempo he dejado de enseñar y de los que no paro de aprender.

A todos muchas gracias. Sé que habré cometido olvidos imperdonables, pero aunque no estén todos los que son, sí son todos los que están. No podía olvidarlos en este acto, uno de los acontecimientos más importantes en mi devenir profesional.

En cuanto al porqué del tema elegido para esta mi toma de posesión como miembro de esta Academia, he querido escoger un tema acorde con la grandeza del acto, que conjuntara dos de mis grandes pasiones como investigador y como veterinario. En primer lugar la salud pública veterinaria, de cuya importancia fui consciente antes casi que de leer cuando junto a mi padre me pasaba largas horas observando en el triquinoscopio las muestras de los cerdos sacrificados en Membrillera, y durante las cuales consiguió transmitirme la importancia que para la salud de las personas tenía la salud del ganado, lema de los Veterinarios Titulares de la época de los que él se sentía muy orgulloso. Y en segundo lugar el estudio de las bacterias patógenas intracelulares facultativas, que han ocupado la mayor parte de mi vida investigadora desde que inicié mi tesina de licenciatura sobre *Listeria monocytogenes* bajo la tutela del Profesor Suárez.

Nada ejemplifica mejor las conjunción de ambos temas que las Micobacterias, en concreto las especies de *Mycobacterium tuberculosis complex*, causantes de una de las plagas más importantes de la humanidad a principios del siglo XX. Una de cada 100 muertes en Europa y Estados Unidos, eran debidas al contagio directo del patógeno desde los animales tuberculosos, fundamentalmente bovinos, o al consumo de alimentos (carne y leche) procedente de ellos. Pues bien, en una campaña sin precedentes, liderada por médicos y veterinarios de la época, se consiguió eliminar prácticamente la enfermedad humana de origen animal, prohibiendo el consumo de alimentos procedentes de animales tuberculosos, pasterizando la leche, inspeccionando la carne y a la postre eliminando las vacas infectadas hasta erradicar la enfermedad en los bovinos de países que tuvieron el acierto de iniciar estos programas. Este programa, pionero en las actuaciones de la veterinaria de salud pública, se estima que ha conseguido salvar al menos 25.000 vidas al año solo en Estados Unidos.

LAS MICOBACTERIAS
COMO EJEMPLO DE PATÓGENOS
EN LA INTERFASE HOMBRE / ANIMAL

HISTORIA DE LAS ENFERMEDADES DEL HOMBRE CAUSADAS POR MICOBACTERIAS

A lo largo de la historia de la humanidad, pocas plagas han originado mayor sufrimiento y causado tanto temor como dos enfermedades causadas por este grupo de bacterias: la tuberculosis y la lepra. La tuberculosis ya era mencionada en algunos libros hinduistas sagrados (Upanishads) como una enfermedad propia de reyes alrededor del 1500 A.C. La lepra, por su parte, adquirió su temible fama no tanto por su mortalidad sino por el fatal destino al que condenaba a sus víctimas, destinadas a sufrir terribles deformidades; de hecho, los leprosos, además de tener que soportar la incapacidad física causada por la enfermedad, han sido considerados históricamente víctimas de una maldición divina, y sometidos a la humillación de la segregación y exclusión social en vida. Ambas enfermedades tienen en común una serie de peculiaridades de sus agentes causales derivadas de la singularidad de su pared, que les confieren unas características tintoriales diferenciales, y unos requerimientos específicos para su cultivo que dificultan su aislamiento in-vitro. Estas particularidades los convierten en unos microorganismos únicos en el imperio procarionta, haciendo que desde su descubrimiento en los albores de la microbiología hayan permanecido agrupados como entes nosológicos diferenciados del resto de las bacterias, y que actualmente se encuentren encuadrados en una familia (*Mycobacteriaceae*) con un solo género (*Mycobacterium*).

La tuberculosis y la lepra han sido consideradas enfermedades de la anti-

güedad debido a que existen descripciones pormenorizadas de ambas en libros de aquellas épocas. Sin embargo no existen razones de peso para considerar que ambas emergieron antes de otros procesos infecciosos que han afectado al hombre humanidad (Brothwell and Sandison, 1967); de hecho, existen evidencias históricas que sugieren que la lepra pudiera haber aparecido en un periodo más reciente. En lo referente a la tuberculosis, se han descrito lesiones compatibles con tuberculosis en un esqueleto del neolítico (alrededor de 4.000 años AC) y en momias egipcias (3700-1000 años AC) (MORSE et al., 1964). La primera descripción detallada de la tuberculosis se encuentra en el *Rig Veda*, un antiguo libro sagrado escrito en sánscrito entre los años 2000 y 1500 AC (Athvale, 1983). Las lesiones causadas por la lepra, aún más características que las tuberculosas, no han sido descritas en restos humanos anteriores al año 350 DC (Brothwell and Sandison, 1967). Existen referencias a la “lepra” en libros sagrados judíos y cristianos de la antigüedad, pero no es posible determinar si la acepción de la palabra fuera lo que hoy entendemos por esta enfermedad. Sin embargo, en libros de medicina de la antigua China (250 AC) sí se menciona una enfermedad de la piel caracterizada por la aparición de nódulos y ulceraciones y pérdida de pelo y de la sensibilidad (Wong and Wu, 1932). Otros tratados de medicina de la india (600-400 AC) también hablan de una enfermedad cutánea similar con alteraciones en la pigmentación, anestesia y trastornos de la sudoración (Gupta, 1909).

En la actualidad, ambas enfermedades constituyen una importante amenaza para la Salud Pública, especialmente en países en vías de desarrollo y en el caso de pacientes inmunocomprometidos, considerándose que un tercio de la población mundial, esto es, 2000 millones de personas, están infectadas, de las cuales un 10% tienen serio riesgo de enfermar a lo largo de su vida. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (Informe sobre el control de la tuberculosis mundial, OMS, 2010), en el 2009 se registraron un total de 9.4 millones de nuevos casos de tuberculosis en todo el mundo, 1.3 millones de muertes en paciente HIV-negativos y 0.38 millones de pacientes de SIDA fallecidos, localizándose la mayor parte de los casos en el Sudeste Asiático (35%), África (30%) y las regiones del Pacífico Oeste (20%). Aproximadamente el 80% de los casos de coinfección de tuberculosis y virus del SIDA se registraron en África debido a las escasas alternativas terapéuticas disponibles para tratar esata enfermedad. Esta situación se ve agravada por la emergencia de cepas multiresistentes (Multi-drug resistant, MDR) y extremadamente resistentes (Extensively drug resistant, XDR) en países que además tiene un acceso limitado a los medicamentos (en julio de 2010 se habían descrito cepas XDR en un total de 58 países y regiones). Las cepas de tuberculosis MDR son resistentes a al menos isoniazida y rifampicina, dos de los

antibióticos anti-tuberculosos de primera línea usados para tratar todos los casos de tuberculosis. Las cepas XDR, por su parte, son aquellas resistentes a isoniazida y rifampicina y además resistentes a cualquier fluoroquinolona y a al menos una de las tres opciones terapéuticas de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina) (CDC, 2010). Por tanto, las alternativas terapéuticas para el tratamiento de aquellos pacientes infectados con cepas de tuberculosis XDR se ven reducidas de forma dramática.

El hecho de que a día de hoy la técnica fundamental de diagnóstico y la única vacuna disponible frente a la tuberculosis tengan casi 100 años de vida debe hacernos reflexionar en que no es posible que se deba exclusivamente a sus prestaciones, sino que más bien está relacionado con el desinterés que provoca esta enfermedad en gran parte del mundo desarrollado. Constatar que prácticamente el 50% de los recursos destinados a la investigación sobre la tuberculosis, su control y posible erradicación provienen de fondos y fundaciones privadas dice mucho a favor de estas instituciones, pero al mismo tiempo muy poco de los estamentos y administraciones oficiales con competencias en esta materia.

Desde el punto de vista de la salud animal, aunque en los países más desarrollados está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de erradicación, en los países en vías de desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica. En Europa occidental, Canadá y Estados Unidos, la infección se ha reducido a niveles inferiores al 0,1% (Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006; Wobeser, 2009). Centro América, con excepción de Nicaragua y el Caribe, tiene porcentajes de animales afectados muy bajos (menos del 1%) (Abalos and Retamal, 2004; De Kantor and Ritacco, 2006; Reviriego et al., 2000), mientras que Cuba está libre de la enfermedad (Abdala, 1998). Los mayores niveles de infección se encuentran en América del Sur (de Kantor and Ritacco, 2006), en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia, con prevalencias del 1% o superiores, siendo las cuencas lecheras las más afectadas (Cosivi et al., 1998).

Dentro de la Unión Europea, la situación relativa a la tuberculosis bovina (que es la contemplada actualmente por la OIE) y su principal agente causal, *M. bovis*, difiere según los países. En el informe anual de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) de 2009 sobre las tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos de la Unión Europea (publicado el 22 de marzo de 2011 en www.efsa.europa.eu), aparecen 11 países miembros (*Member States*, MS) calificados como libres de tuberculosis bovina (*officially tuberculosis-free*, OTF) (Bélgica, República

Checa, Dinamarca, Alemania, Francia, Luxemburgo, Holanda, Austria, Eslovaquia, Finlandia y Suecia), 2 países no miembros (Noruega y Suiza), así como 16 provincias y 3 regiones de Italia (European Food Safety Authority, 2010). El resto de países considerados como no libres de tuberculosis (*non-officially tuberculosis-free*, non-OTF) (Portugal, España, Reino Unido, Irlanda, Eslovenia, Hungría, Rumanía, Bulgaria, Grecia, Malta, Chipre, Lituania, Letonia y Estonia) presentan diversas prevalencias de esta infección, siendo Irlanda y Reino Unido las de mayor prevalencia (5,9% y 2,8%, respectivamente). La erradicación se define como la consecución de no más de 0,1% de rebaños bovinos infectados por año durante 6 años consecutivos, y que al menos el 99,9% de los rebaños sean oficialmente libre durante esos 6 años consecutivos. En muchos de esos países no libres de la enfermedad el ganado caprino también es importante. Países como Grecia o España tienen un importante censo caprino y la tuberculosis también se ha detectado en pequeños rumiantes (Aranaz et al., 1998; Crawshaw et al., 2008a), por lo tanto, el ganado caprino enfermo podría actuar como fuente de infección para el ganado bovino y además dificultar o retrasar los procesos de erradicación de la infección en el ganado bovino. También es de vital importancia el control de la tuberculosis en el ganado caprino en países libres de la infección, con objeto de confirmar que están libres de la misma y minimizar el riesgo de transmisión al ganado bovino.

Aunque la morbilidad de la lepra a nivel mundial es muy inferior con respecto a la tuberculosis, en la actualidad hay más de 213.000 casos registrados en el mundo, fundamentalmente localizados en Asia y África, y según datos de la OMS en el 2008 se notificaron aproximadamente 249.000 nuevos casos, lo que da idea de que estamos lejos de haber controlado esta enfermedad a nivel mundial. Las lesiones características a las que da lugar la enfermedad en piel, extremidades y ojos, unido al daño irreversible que puede causar en el sistema nervioso, la convierten en un estigma para las personas afectadas. La situación actual de la lepra es especialmente dramática si se tiene en cuenta que es una enfermedad curable que, cuando es sometida a tratamiento durante las fases tempranas, no desemboca en las incapacidades permanentes típicas de las personas afectadas, habiéndose desarrollado incluso vacunas combinadas con la BCG en los últimos 40 años. De hecho, la marginación que sufren las personas afectadas es uno de los principales problemas a la hora de combatir la enfermedad, ya que dificulta en gran medida que el propio paciente informe sobre su enfermedad. Por tanto, para su lucha es fundamental el diagnóstico precoz (para el cual es necesario cambiar la imagen de la lepra a nivel mundial, nacional y local, dando lugar a una situación en la que los pacientes busquen atención médica lo antes posible) y el tratamiento múltiple

con una batería de medicamentos. Este tratamiento consiste en la aplicación combinada de dapsona, el primer componente con actividad anti-*M. leprae* utilizado pero frente al cual se han detectado bacterias resistentes, rifampicina y clofazimina. Ambos elementos (diagnóstico y tratamiento) no son especialmente complicados, y en la actualidad se realizan grandes esfuerzos para generalizar su aplicación en los países endémicos. Las zonas con una mayor incidencia de la enfermedad se concentran en Angola, Brasil, la India, Madagascar, Mozambique, Nepal, y las Repúblicas Centroafricana, del Congo y de Tanzania.

EL GÉNERO *MYCOBACTERIUM*

Según la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) el género *Mycobacterium* (*M.*) está encuadrado en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycelates*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*. Este género incluido dentro de las bacterias gram positivas con alto contenido en G+C en su ADN comprende más de 140 especies entre las que se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos para el hombre y los animales, algunas de ellas de carácter zoonótico. Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas pero sobre todo la dificultad del cultivo de las principales especies patógenas y su ácido-alcohol resistencia. Esta última propiedad se debe al elevado contenido en lípidos en su pared celular, entre los que se incluyen los característicos ácidos micólicos. Estos ácidos micólicos son largas cadenas de ácidos grasos de más de 50 átomos de carbono, característicos del género *Mycobacterium* y en menor medida del género *Corynebacterium* y otros géneros de bacterias gram positivas relacionadas con alto contenido en G+C en su ADN, presentan un carácter fuertemente hidrofóbico que condiciona el fisiologismo de estas bacterias.

La pared celular, junto con la membrana citoplasmática y la cápsula mico-bacteriana, constituye un elemento esencial para asegurar la supervivencia de la bacteria y su replicación en el entorno intracelular (incluyendo entornos muy adversos como fagosomas y fagolisosomas), otra de las características

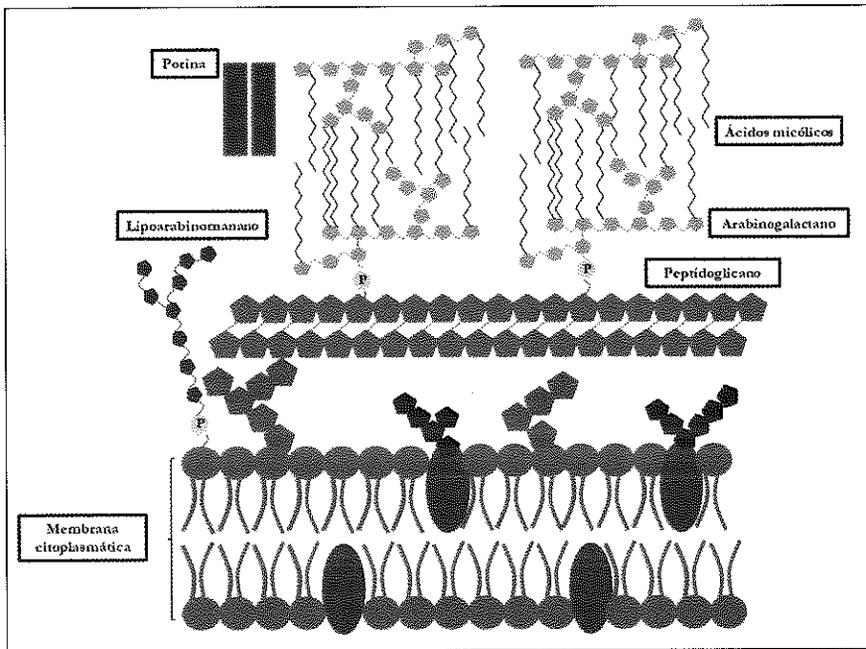


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de micobacteriana.

importantes de los patógenos más relevantes del género. Las características diferenciales de la pared celular de las micobacterias son unos de los rasgos fundamentales que sentaron las bases de la identificación de este género, dotándolas entre otras cosas de sus particulares características tintoriales (“ácido-alcohol resistencia”). Esta pared está formada por tres componentes: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos unidos de forma covalente. Las uniones covalentes de los ácidos micólicos dan lugar a una capa hidrofóbica, también llamada “micomembrana”, que forma una capa lipídica alrededor del organismo. Esta capa constituye una ventaja diferencial para los miembros del complejo *M. tuberculosis*, ya que son patógenos intracelulares que se replican en un ambiente hostil, el interior de los macrófagos. La parte externa de la micomembrana contiene varios lípidos libres, tales como glicolípidos fenólicos, que se intercalan entre los ácidos micólicos, siendo la mayor parte de estos lípidos específicos de las micobacterias. La capa externa está formada por policosacáridos (glucano y arabinomano) y proteínas más una cantidad relativamente reducida de lípidos (Abdallah et al., 2007). En aquellas micobacterias no patógenas la capa externa consiste fundamentalmente en

proteínas, mientras que en las micobacterias patógenas los polisacáridos son más abundantes (Daffé and Etienne, 1999).

El alto contenido en lípidos de la pared celular de las micobacterias y la longitud de la cadena de los ácidos micólicos les confiere una gran resistencia ambiental, pudiendo por tanto sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el medio en condiciones de baja humedad. Sin embargo, las micobacterias son sensibles al efecto de la luz solar, las radiaciones ultravioletas y la pasteurización. Uno de los miembros más ilustres del género, *Mycobacterium bovis*, ha sido objeto de un gran número de estudios, que han demostrado que su capacidad de supervivencia en el entorno se ve afectada por la carga bacteriana inicial, la existencia de un sustrato orgánico, el pH, la temperatura, la humedad, la exposición a la luz solar y posibles interacciones con otros microorganismos (Scanlon and Quinn, 2000). Así, *M. bovis* puede sobrevivir hasta cinco meses en heces con bajas temperaturas, y hasta dos años en estiércol. Sin embargo, en condiciones normales la supervivencia ambiental de este patógeno puede reducirse a algunas semanas (Menzies and Neill, 2000).

La envuelta de las micobacterias tiene también una gran importancia en las interacciones entre patógeno y hospedador en el caso de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Besra et al., 1994; Brennan and Nikaido, 1995) como elementos moduladores de la respuesta inmune del hospedador (Rastogi et al., 2001a). Ciertos lípidos de la envuelta celular como el PDIM (*phthiocerol dimycocerosate*) son considerados factores de virulencia de gran relevancia, ya que distintas pruebas con mutantes deficientes en PDIM han demostrado una capacidad de crecimiento atenuada en el modelo ratón (Cox et al., 1999). Aquellos factores de virulencia implicados en la inmunopatogénesis de la tuberculosis podrían ser dianas potenciales para tratamientos preventivos o terapéuticos, y por ello han sido objeto de diversos estudios durante los últimos años. El lipoarabinomanano, (LAM), otro componente destacado de la pared, es un fosfatidil-inositol-lipoglicano con una importante actividad biológica (Hunter, 1990). En función de su estructura molecular se han descrito tres tipos diferentes de LAM que podrían ser factores de virulencia (Guerardel et al., 2002). También se ha correlacionado la presencia de sulfolípidos en bacterias patógenas con su virulencia en el modelo de cobaya. Se ha demostrado que el ácido micólico que contiene trehalose-6,6'-dimycolato (TDM) (o "cord-factor") es capaz de dar lugar a granulomas en el ratón (Yamagami et al., 2001); de igual forma, una lipoproteína de 19kDa detectada en la pared está implicada en un amplio abanico de respuestas inmunológicas, si bien todavía no se conoce bien su función. Existen numerosas evidencias experimentales que demuestran el papel de los lípidos de la pared celular como fac-

tores de virulencia, pero sus efectos en la respuesta inmune del hospedador todavía no se conocen con exactitud. El efecto inmunológico pleiotrópico de estas moléculas dificulta precisar el mecanismo concreto mediante el cual contribuyen a la inmunopatogénesis de la tuberculosis (Karakousis et al., 2004a). El panorama se complica aún más por el hecho de que algunos lípidos de la pared celular claves pueden ser excretados solamente en ciertas condiciones o durante una infección, lo que complica enormemente su estudio (Minnikin et al., 2002). Estudios recientes sugieren que las micobacterias cuentan con mecanismos de secreción especiales para la excreción de factores de virulencia al medio extracelular o en la célula hospedadora (Abdallah et al., 2007). Estos descubrimientos pueden abrir nuevas puertas a la investigación sobre la virulencia de las micobacterias patógenas.

Esta característica pared celular de las micobacterias fue puesta de manifiesto mediante una tinción diferencial, desarrollada de forma independiente por un bacteriólogo y un patólogo alemán, Friedrich Neelsen y Franz Ziehl, en 1882-1884, en forma de lo que hoy se conoce en su honor como tinción de Ziehl-Neelsen. Este tinción se basa en la dificultad de estos microorganismos para teñirse y decolorarse con alcohol clorhídrico (a diferencia del resto de las bacterias) debido precisamente a su pared, denominándose por este motivo ácido alcohol resistentes, siendo este método ampliamente utilizado en nuestros días por microbiólogos y patólogos más de 100 años después de su desarrollo. Además, ha servido para denominar y agrupar a las bacterias como entidad independiente del resto de las bacterias.

Taxonomía

Se han elaborado numerosas clasificaciones de este género a lo largo de los años, atendiendo primero a características fenotípicas, patogenicidad y, desde finales del siglo pasado, a los genotipos. La clasificación más intuitiva y de más fácil aplicación es aquella que divide las micobacterias en **no cultivables o difícilmente cultivables** (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y **cultivables**. Dentro de estas últimas se establece una subdivisión en micobacterias de **crecimiento rápido** (aquellas que dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días) y las de **crecimiento lento** (las que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido). Esta subdivisión basada en la capacidad de crecimiento se confirma al secuenciar el gen que codifica el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S de las micobacterias: mientras que casi todas las micobacterias de crecimiento lento poseen una sola copia del gen ARNr 16S [excepto *M. terrae* (Ninet et al., 1996) y *M. ceta-*

tum (Reischl et al., 1998)], las de crecimiento rápido, excepto *M. chelonae* y *M. abscessus*, presentan dos copias (Tortoli et al., 2004). El análisis de la secuencia de este gen, así como de la conformación de su estructura secundaria, ha sido la herramienta más utilizada para los estudios taxonómicos y filogenéticos del género. Así, además de diferenciar los dos grandes grupos determinados por su velocidad de crecimiento, también subdivide las micobacterias de crecimiento lento basándose en la estructura de la hélice 18 (Stahl and Urbance, 1990; Tortoli, 2003; Tortoli, 2006)

Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de especies saprofitas de vida libre y normalmente no patógenas, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Con frecuencia son llamadas “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas”, si bien este último término también puede aplicarse a algunas bacterias de crecimiento lento. Algunas especies bacterianas de este grupo han adquirido una mayor relevancia en las últimas décadas debido a su capacidad para producir infecciones en la especie humana, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Desde el punto de vista de Salud Pública, las micobacterias de crecimiento rápido de mayor importancia pertenecen a los grupos *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae/abscessus*, *M. marinum* y *M. smegmatis* (Brown-Elliott and Wallace, Jr., 2002).

Por otro lado, el grupo de micobacterias de crecimiento lento engloba las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública. En este grupo se encuadra el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC), que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y en mamíferos. El complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium* complex, MAC), también posee una elevada relevancia en el ámbito veterinario y, recientemente, son objeto de un número creciente de estudios desde el punto de vista de Salud Pública.

Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

- M. tuberculosis* (Koch,1882)
- M. bovis* (Karlson y Carr,1970)
- M. bovis* BCG (Grange,1983)
- M. africanum* (Castets y Serrats,1969)
- M. microti* (Reed,1957)
- M. caprae* (Aranaz y col., 2003)
- M. pinnipedi* (Cousins y col., 2003)
- M. canetti* (van Soolingen y col., 1997)
- Var. genética *Oryx bacillus* (Lomme y col., 1976)
- Var. genética *Dassie bacillus* (Wagner y col,1958)
- Var. genética *M.mungi* (Alexander y col,2010)

Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

- M. avium* subsp. *avium* (Thorel y col., 1990)
- M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel y col., 1990)
- M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Thorel y col., 1990)
- M. avium* subsp. *hominissuis* (Mijs y col., 2002)
- M. intracellulare* (Runyon, 1967)
- M. arosiense* (Bang y col., 2008)
- M. chimaera* (Tortoli y col., 2004)
- M. columbiense* (Murcia y col., 2006)
- M. marseillense* (Ben, I y col., 2009)
- M. bouchedurhonense* (Ben, I y col., 2009)
- M. timonense* (Ben, I y col., 2009)

Micobacterias no cultivables o difícilmente cultivables

- M. leprae*
- M. lepraemurium*

Micobacterias atípicas de importancia zoonósica

- M. kansasii*
- M. fortuitum*
- M. marinum*
- M. chelonae*

*no aceptadas como especies por el comité internacional de taxonomía bacteriana

Tabla 1. Principales especies o variantes genéticas* de micobacterias de crecimiento lento en Medicina Veterinaria y Salud Pública.

EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) se caracteriza por causar tuberculosis en humanos y otros mamíferos e incluye varias especies: *M. tuberculosis* (Koch, 1882), *M. bovis* (Karlson and Lessel, 1970), *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin), *M. africanum* (Castets et al., 1969), *M. microti* (Reed, 1957), *M. caprae* (Aranaz et al., 2003a), *M. pinnipedii* (Cousins et al., 2003), *M. canetti* (van Soolingen et al., 1997a). Además, dentro del complejo MTBC se incluyen dos variantes genéticas no aceptadas hasta el momento con el rango de especie por el comité internacional de taxonomía bacteriana el *Oryx bacillus* (aislado a partir del órice de Arabia (*Oryx leucoryx*) (Lomme et al., 1976) y el *Dassie bacillus* (aislado a partir del damán roquero, *Procavia capensis*) (WAGNER et al., 1958). Desde el punto de vista taxonómico clásico todas ellas podrían ser incluidas en una sola especie ya que se caracterizan por presentar una homología del 99,95% en su genoma, con una proporción elevada de bases G+C (aproximadamente el 65%), y poseer una secuencia idéntica de la subunidad 16S del ARNr (Böddinghaus et al., 1990; Sreevatsan et al., 1997). Sin embargo, el hecho de que estas especies difieren ampliamente en la preferencia de hospedador, en su patogenicidad y que existen diferencias genotípicas y marcadores genéticos claramente reconocibles han conducido, como en otros casos de la bacteriología, a que la “especie” *Mycobacterium tuberculosis* original se subdividiera en variantes patogénicas a las que se confirió el rango de especie, agrupándolas posteriormente todas ellas en un complejo que engloba todas las especies capaces de producir tuberculosis en el hombre y los animales.

El origen de la diversidad genética de las especies comprendidas en el

complejo *M. tuberculosis* estaría íntimamente ligada con la historia (y la prehistoria) de sus hospedadores primarios, remontándose la historia del carácter zoonótico de estas bacterias a la domesticación de los bóvidos: esta hipótesis se vería sustentada por el hecho de que la primera bacteria del complejo era un ancestro del actual *M. tuberculosis*. Esto hace pensar que a diferencia de otras muchas enfermedades, la tuberculosis pudo tener su origen en el hospedador humano pasando después a los bovinos y diseminándose con ellos. Sin embargo, no se ha podido determinar si la tuberculosis bovina se introdujo en Europa junto con los primeros bovinos que llegaron o más tarde, infectando ganado que no tenía inmunidad frente a la enfermedad. El patógeno habría entonces aprovechado un nicho ecológico propicio para expandirse de forma clonal a partir de las cepas originales. Así, el ganado habría sido infectado por una cepa ancestral de *M. bovis* que tenía un número máximo de espaciadores en la región DR, derivada de un organismo próximo al *M. tuberculosis* (Mostowy et al., 2005; Smith et al., 2006).

De cualquier forma, y a pesar de los últimos estudios filogenéticos de las poblaciones de *M. bovis*, y de los análisis de las deleciones cromosómicas y mutaciones puntuales, que han contribuido a esclarecer el panorama de la evolución del complejo *M. tuberculosis* y de *M. bovis* en particular, las teorías sobre la edad de esta bacteria y su diseminación siguen siendo meras especulaciones. Será necesario el análisis completo del genoma de varias cepas de distintos orígenes para establecer filogenias sólidas que puedan completar este escenario. En la actualidad varios proyectos de secuenciación de especies del complejo en los que nuestro grupo está implicado están en marcha, y sin duda contribuirán a una mayor comprensión de la evolución del complejo y de *M. bovis* en particular.

Tradicionalmente, la identificación de estas especies se ha realizado basándose en sus características fenotípicas, existiendo una amplia lista de pruebas bioquímicas, tales como la reducción de nitratos, la producción de niacina, o la resistencia a la piracinamida, y las propiedades de cultivo que ayudan a discernir entre varias especies de micobacterias (Rastogi et al., 2001b). Sin embargo, debido a que las características fenotípicas no permiten una identificación precisa, rápida y segura de todas las especies, la identificación actual se basa principalmente en la presencia o ausencia de ciertas regiones del genoma (*regions of difference*, RDs) (Gordon et al., 1999) o la presencia de mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Estas se han detectado gracias al desarrollo de técnicas moleculares y al conocimiento de los genomas de algunas especies incluidas en este complejo (Behr and Mostowy, 2007; Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2005).

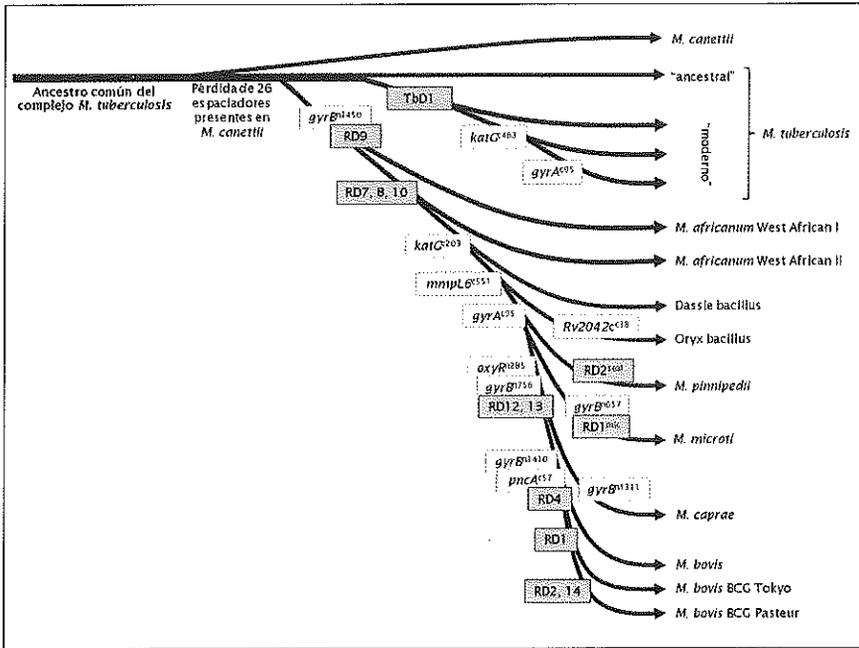


Figura 2. Evolución del complejo *M. tuberculosis* basada en la presencia/ausencia de regiones de diferencia (RD) y polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). Rectángulos en gris indican la pérdida de una RD. Rectángulos en blanco indican los SNPs; los superíndices marcan la posición de la mutación en el nucleótido (n) o codón (c) del gen en cuestión. Adaptado de Brosch et al. (2002), incluyendo información de Kasai et al. (2000), Niemann et al. (2000b), Cousins et al. (2003), Bigi et al. (2005), Smith et al. (2009b), de Jong et al. (2010) y van Ingen et al. (2010).

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (*sensu stricto*) fue descrito por primera vez por Robert Koch en 1882, de ahí su sobrenombre “bacilo de Koch” (Koch, 1882). Principalmente afecta al hombre y a los primates, y es responsable del 99% de todos los casos de tuberculosis en humanos. Sin embargo, también ha sido encontrado en el ganado bovino (Fetene et al., 2009; Prasad et al., 2005; Srivastava et al., 2008) y caprino (Cadmus et al., 2009a), en cerdos (Mohamed et al., 2009; Parra et al., 2003), en gatos y perros (Aranaz et al., 1996b; Clercx et al., 1992; Erwin et al., 2004), aves (Hoop et al., 1996; Schmidt et al., 2008), y varias especies de animales salvajes, incluyendo algunas de las que se encuentran en los parques zoológicos (Alexander et al., 2002; Montali et al., 2001; Une and Mori, 2007).

En 1998 se hizo pública la secuencia completa del genoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998), que ha sido la base para establecer su relación con otros miembros de MTBC, así como para realizar los estudios posteriores sobre la evolución de este complejo. El conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre los miembros del complejo *Mycobacterium* ha llevado a modificar la relación de *M. tuberculosis* con otros miembros del mismo género, ya que este patógeno está considerado ahora como una bacteria muy poco representativa de un género compuesto mayoritariamente por bacterias saprofitas y oportunistas, al modo de un “hijo caprichoso de unos padres honorables”.

Mycobacterium bovis

A pesar de haber sido utilizado con anterioridad para referirse a las cepas productoras de tuberculosis bovina, el nombre de *Mycobacterium bovis* no fue reconocido oficialmente hasta 1970 (Karlson and Lessel, 1970). Actualmente es conocida por ser el principal agente causante de la tuberculosis bovina. Sin embargo, este bacilo tuberculoso tiene el rango de hospedadores más amplio de todos los miembros de MTBC. El principal grupo de animales afectados por este bacilo se encuadra en la familia *Bovidae* (bóvidos), subfamilia *Bovinae* (bovinos) y, dentro de ésta en la tribu *Bovini*, que engloba distintos géneros: *Bubalus* (búfalos), *Bos* (bueyes), o *Bison* (bisontes). A parte de los bovinos, este patógeno también se ha aislado de otros bóvidos, como los incluidos en la subfamilia *Caprinae* (caprinos), en el que se encuentran los géneros *Capra* (cabra) (Cadmus et al., 2009a; Cousins, 2001; Crawshaw et al., 2008a) y *Ovis* (ovejas) (Malone et al., 2003). Su relevancia como agente etiológico de la tuberculosis en la familia *Suidae* (suidos), y en concreto en el género *Sus* (cerdos y jabalíes) también es importante (Parra et al., 2003; Rodríguez et al., 2010). Otras especies afectadas han sido los caballos (Monreal et al., 2001), perros (Ellis et al., 2006; Shrikrishna et al., 2009) y gatos (Aranaz et al., 1996b; Monies et al., 2006). Además se ha aislado de una amplia gama de animales salvajes de vida libre, como los zorros, ciervos, gamos, jabalíes, tejones, zarigüeyas, linceos, liebres, y primates no humanos, entre otros (Aranaz et al., 2004; Corner, 2006; Gallagher and Clifton-Hadley, 2000; O'Brien et al., 2002; Ryan et al., 2006; Une and Mori, 2007). También afecta al hombre debido al carácter zoonótico de la enfermedad (Cosivi et al., 1998; Dankner et al., 1993; Michel et al., 2010).

El grupo liderado por Garnier y colaboradores realizó la secuenciación del genoma del aislado *M. bovis* AF2122/97 (Garnier et al., 2003). Gracias a este

estudio se confirmó que el genoma de *M. bovis* es más reducido que el de *M. tuberculosis*.

***Mycobacterium bovis* BCG**

Mycobacterium bovis BCG (Bacilo Calmette-Guérin) es una cepa de *M. bovis* atenuada por sucesivos cultivos en medio con patata, bilis y glicerol, entre los años 1908 y 1919. De esta cepa original se han mantenido subcultivos en diferentes laboratorios durante décadas, produciéndose una deriva genética que ha originado diferentes cepas (Grange et al., 1983). En función de su crecimiento en cobayas y ratones, dependiendo de la multiplicación en el punto de inoculación y la diseminación al bazo desde los ganglios linfáticos, se clasifican en fuertes (por ejemplo las cepas Pasteur y Copenhagen) y débiles (por ejemplo Glaxo). *M. bovis* BCG posee el crecimiento y la morfología de *M. tuberculosis*, y las características bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos característicos de *M. bovis*.

Mycobacterium caprae

Los aislados españoles de MTBC procedentes de cabras fueron originalmente clasificados como *M. bovis* (Aranaz et al., 1996a). Sin embargo, estudios fenotípicos y genotípicos realizados en 1999 propusieron la subespeciación de estos aislados como *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz et al., 1999a). Sin embargo, tres años después Niemann y colaboradores sugirieron un cambio en la nomenclatura de estas cepas tomando la denominación de *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann et al., 2002a), ya que asumían una mayor proximidad entre los aislados caprinos y *M. bovis* que con *M. tuberculosis*. Posteriormente Aranaz y colaboradores aportaron nuevas pruebas moleculares y esta subespecie fue elevada a especie *Mycobacterium caprae* (Aranaz et al., 2003a).

El hospedador principal de esta especie bacteriana es la cabra aunque, como ocurre con otros miembros de MTBC, no se excluye la posibilidad de infección a otras especies animales. De hecho, en los últimos años se han encontrado aislados en otras especies domesticadas como el ganado bovino, ovino y porcino, estando en algunas ocasiones en contacto estrecho con las cabras (Aranaz et al., 1999a; Aranaz et al., 1996a; Boniotti et al., 2009; Duarte et al., 2008). Al igual que ocurre con *M. bovis*, también se han aislado *M. caprae* en animales salvajes, tales como el ciervo y el jabalí (Gortázar et al.,

2005; Parra et al., 2005). De igual modo, también se han identificado casos de tuberculosis en humanos producidos por *M. caprae* (Gutiérrez et al., 1997; Kubica et al., 2003; Prodingler et al., 2002).

Mycobacterium africanum

Mycobacterium africanum fue descrito como nueva especie en 1969 (Castets et al., 1969). Las publicaciones existentes sugieren que *M. africanum* difiere de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el hospedador, la fuente de infección, la distribución geográfica, la virulencia y la patogénesis. Esta especie tiene importancia como productor de la tuberculosis en el continente africano, causando infecciones principalmente en el hombre y en los primates (Thorel, 1980). Por otra parte, también han sido descritos algunos casos de tuberculosis en ganado vacuno producido por *M. africanum* (Rahim et al., 2007).

Las cepas de *M. africanum* presentan una heterogeneidad fenotípica que dificulta su identificación en algunos casos. Los genotipos y fenotipos de esta especie varían dependiendo de la distribución geográfica (Haas et al., 1997a; Haas et al., 1997b). Collins y colaboradores usaron la prueba de la reducción del nitrato para dividir las cepas en dos grupos: grupo I (negativo) y grupo II (positivo) (Collins et al., 1982a) Los aislados del grupo I estaban asociados generalmente con África occidental y los del grupo II con África oriental, aunque más recientemente se ha encontrado la misma proporción de estos grupos en ambos extremos del continente africano. La tasa de aislamiento de esta especie en otros continentes es muy baja (Grange and Yates, 1989). Por otro lado, la virulencia de esta especie en modelos experimentales es menor comparada con *M. tuberculosis* (Castets and Sarrat, 1969) y el patrón de la enfermedad es también distinto habiéndose aislado muy esporádicamente, por ejemplo, de humanos con tuberculosis genitourinaria (Grange and Yates, 1989).

Mycobacterium canetti

Mycobacterium canetti es una variante muy rara de *M. tuberculosis* y ha sido aislado normalmente de pacientes africanos o con alguna conexión con este continente. Fue descrito por primera vez en Francia por Canetti en 1969 y denominado como tal por van Soolingen y colaboradores (van Soolingen et al., 1997a). Aunque comparte la homología con el resto de miembros de MTBC en lo que respecta al ARNr 16S, *M. canetti* difiere en varios aspectos,

incluyendo polimorfismos en ciertos genes del metabolismo basal (*house-keeping genes*), por ejemplo el gen *recA*, el número de copias de la secuencia de inserción *IS1081* (una única copia), la morfología de las colonias (lisas y brillantes) y el contenido lipídico de la pared celular, entre otros (Brosch et al., 2002; van Soolingen et al., 1997a).

Mycobacterium microti

M. microti fue aislado en 1930 de ratas de campo (Wells and Oxen, 1937) y denominado como tal por el doctor Reed (Reed, 1957). Esta especie afecta principalmente a pequeños roedores (Cousins et al., 1994; Lutze-Wallace et al., 2006), aunque ciertos animales como los gatos (Gunn-Moore et al., 1996; Kremer et al., 1998), cerdos (Huitema and Jaartsveld, 1967) y las llamas (Pattyn et al., 1970), parecen ser especialmente sensibles. Todos estos casos se han detectado en clínicas veterinarias y, por lo tanto, es improbable que reflejen la situación real debido a las dificultades en el diagnóstico laboratorial. Particularmente, preocupa la transmisión de *M. microti* a los animales de compañía, principalmente los gatos, ya que podrían infectarse de roedores salvajes enfermos. Sin embargo, hasta la fecha, esta hipótesis no es cierta ya que los genotipos encontrados en *M. microti* aislados de gatos y de roedores no son iguales (Kremer et al., 1998). La incidencia de la infección por *M. microti* en granjas y animales domésticos es desconocida aunque se ha aislado de cerdos (Taylor et al., 2006).

A diferencia del estudio realizado por Kremer y colaboradores, Smith y colaboradores realizaron un estudio en Gran Bretaña sobre aislados de *M. microti* procedentes de distintas especies, tales como gatos, alpacas tejones, vacas, cerdos, hurones, ratones de campo, nutrias, ponis y humanos (Smith et al., 2009). Smith estableció que los perfiles moleculares más frecuentemente encontrados en los gatos se correspondían con los más comunes en otros mamíferos aunque no consideró a los felinos como el reservorio que mantiene la enfermedad sino un simple transmisor de la misma. Sorprendentemente, estableció una relación entre la coexistencia de *M. microti* y *M. bovis*: las áreas en las que se encontró *M. microti* en animales salvajes y en gatos se correspondían con zonas de baja prevalencia de tuberculosis bovina producida por *M. bovis*. Esto sugirió que una infección por *M. microti* podría suponer cierta protección a una infección por *M. bovis*.

También se han publicado algunas descripciones, aunque escasas, en pacientes inmunosuprimidos o con alguna alteración en el sistema inmune

(Emmanuel et al., 2007; van Soolingen et al., 1998). Además, *M. microti* también se ha usado en ensayos clínicos para valorar su eficacia y seguridad como vacuna frente a la tuberculosis, observándose que es una vacuna segura aunque existe discrepancia en su eficacia comparada con la vacuna con *M. bovis* BCG (Hart and Sutherland, 1977a; Manabe et al., 2002).

Mycobacterium pinnipedii

El nombre inicial que se le asignó a esta bacteria fue el bacilo de las focas o “*seal bacillus*”, debido al hospedador en el que se aisló por primera vez (Cousins et al., 1993) y fue propuesta como especie nueva de MTBC en 2003 (Cousins et al., 2003). Entre 1986 y 1995 fue aislado de casos de tuberculosis en leones marinos cautivos y en libertad, y en varias especies de focas en Nueva Zelanda, Australia, América del Sur y Reino Unido (Bernardelli et al., 1996; Cousins et al., 1993; Forshaw and Phelps, 1991). Aunque las focas parecen ser su hospedador natural, también es patógeno en cobayas, conejos, humanos (Kiers et al., 2008; Thompson et al., 1993), tapires y, posiblemente en vacuno, constituyendo un serio problema en algunos zoos, donde la infección inicialmente localizada en mamíferos marinos se ha extendido al resto de mamíferos.

Oryx bacillus

El *Oryx bacillus* fue aislado por primera vez de dos órices (también llamado órix, antilope o gacela órice) en 1976 (Lomme et al., 1976). Este bacilo se ha identificado en escasas ocasiones y siempre asociado a las distintas especies de antílopes, tanto en libertad como en cautividad (Greth et al., 1994; van Soolingen et al., 1994). Este bacilo fue identificado como *M. bovis* en los primeros estudios por sus similitudes genéticas, del que se diferenciaba únicamente en el número de copias de la secuencia de inserción IS6110 (hasta 20 copias). Sin embargo, un exhaustivo análisis genómico detectó mutaciones en el gen *gyrB* no descritas previamente y su evolución dentro de MTBC se presupone anterior a *M. bovis* y *M. caprae* (Huard et al., 2006).

Dassie bacillus

El *Dassie bacillus* fue identificado por primera vez a finales de los años 50 como un microbio capaz de sobrevivir en ambientes ácidos, de crecimiento

rápido, causante de tuberculosis pulmonar en el llamado damán roquero o damán de El Cabo (*Procavia capensis*) (SMITH, 1960; WAGNER et al., 1958). Este bacilo fue aislado de nuevo en los años 80 al causar tuberculosis en una colonia de damanes en cautividad en un zoo de Australia y de un suricata en un zoo de Suecia (Cousins et al., 1994; Mostowy et al., 2002). Inicialmente, *Dassie bacillus* ha sido propuesto como una variante atenuada de *M. microti* por su fenotipia. A pesar de conocerse otras características biológicas del mismo que le distinguen de *M. microti*, esta idea persiste en la actualidad (Frota et al., 2004).

Mycobacterium mungi

Descrita a partir de aislados de brotes de tuberculosis, que cursaban con alta mortalidad en mangostas que vivían cerca de humanos en Botsuana (Alexander y col, 2010) .

La enfermedad

Como se ha mencionado anteriormente todas las especies del complejo, en mayor o menor grado, pueden producir en una serie de especies hospedadoras la enfermedad que conocemos como tuberculosis y que se caracteriza por generar lesiones granulomatosas características en linfonodos y ocasionalmente en órganos parequimatosos. Resulta indiscutible que la tuberculosis ha afligido al hombre desde sus albores, y se ha especulado con la posibilidad de que la enfermedad saltara al reservorio animal cuando comenzó el proceso de domesticación en el neolítico {MORSE, 1964 8 /id}. Esta enfermedad es, posiblemente, la patología causada por una micobacteria más frecuentemente descrita en el mundo (Collins et al., 1982b) y actualmente es responsable de más de 5000 muertes al día. De todas las enfermedades infecciosas es la causa de muerte más frecuente en adultos y en niños solo se ve superada por las enfermedades agudas respiratorias y las diarreas.

Pocas enfermedades han recibido un número de nombres tan amplio como la tuberculosis: fue llamada “*phthisis*” por los galenos de la antigua Grecia (como Hipócrates) en referencia al debilitamiento corporal al que daba lugar. Otros nombres posteriores, como “consunción”, tienen el mismo origen. La linfadenitis tuberculosa también ha sido llamada “escrófula”, tal vez una abreviatura del latín “*scrofa*” (piara), aunque el origen de este término no está claro. Algunos autores han especulado sobre la similitud de los linfonodos con

los prominentes ganglios maxilares del cerdo; otros han comparado los nódulos tuberculosos “excavados” bajo la piel con los hábitos de escarbar del cerdo. Otra explicación se basa en la apariencia “porcina” que tendrían los niños enfermos debido al cuello engrosado, la cara hinchada y la anemia y debilidad causada por la enfermedad. Otro nombre, “la maldición del rey”, derivaría de la supuesta capacidad de los reyes de curar a un enfermo mediante su contacto real. Diversas alteraciones patológicas han recibido el nombre de “tubérculos” en la historia, pero fue en el siglo XVII cuando Franciscus Sylvius (1614-1672) usó este término por primera vez para referirse a la lesión propia de la tuberculosis. El nombre actual de la enfermedad es relativamente reciente, y probablemente fue usado por primera vez por Schönlein en 1839.

Las hipótesis sobre la posible etiología de la tuberculosis han variado enormemente con el transcurso del tiempo. Durante siglos, se especuló sobre un origen hereditario de la misma. Sin embargo, los trabajos de Louis Pasteur plantearon la hipótesis de la existencia de un agente transmisible en el origen de la enfermedad, y dicha transmisión fue demostrada experimentalmente por Jean-Antoine Villemin, un cirujano militar francés en 1868. Por lo tanto “no era cuestión de si había un bacilo tuberculoso, sino de quién lo encontraría primero. Fue el 24 de marzo de 1882, fecha posteriormente declarada “día mundial de la tuberculosis”, cuando Robert Koch anunció ante la Sociedad de Fisiología de Berlín que había sido capaz de aislar el agente causal de la tuberculosis humana y animal. Su descubrimiento fue rápidamente aceptado por la comunidad científica, y confirmado en Gran Bretaña y los Estados Unidos por otros investigadores. El legado científico de Koch es posiblemente uno de los trabajos que más impacto ha tenido en el desarrollo de la medicina moderna de la investigación, teniendo incluso un impacto negativo en cierto sentido: el enfoque reduccionista derivado de centrar el proceso infeccioso en su agente causal ha llevado en algunos momentos a una subestimación de la importancia de las condiciones ambientales en el desencadenamiento de las enfermedades en el individuo y la comunidad, llevando a Waaler a decir que “sin el descubrimiento de Koch, la vertiente socio-económica de la tuberculosis habría resultado más evidente, y la redistribución de la riqueza de la comunidad habría podido convertirse en una demanda más importante” (Waaler, 1982).

En cuanto a su nomenclatura, el primer nombre que recibió esta bacteria fue simplemente “bacilo tuberculoso” (*Tuberkelbazillus*), posteriormente fue llamado *Bacillus tuberculosis* y por último ya *Mycobacterium tuberculosis*. El nombre genérico procedía de la habilidad del bacilo para crecer en forma de

película con aspecto de hongo en el medio líquido. Posteriormente se demostraría la capacidad de *M. bovis* y *M. caprae* de causar una enfermedad clínicamente indistinguible en el hombre de la causada por *M. tuberculosis*. Precisamente la imposibilidad de diferenciar entre estos agentes etiológicos atendiendo solo a criterios clínicos puede conducir a una subestimación del número de casos reales de tuberculosis debido a estas bacterias, ya que con frecuencia los informes de tuberculosis no distinguen entre los miembros del complejo que puedan causar la enfermedad. Esta situación es particularmente grave en los países en vías de desarrollo, donde los sistemas de identificación bacteriana, que requieren una cierta inversión, no suelen estar disponibles. En el caso de *M. caprae* la prevalencia real en el hombre es aún más difícil de estimar, ya que es cuya descripción taxonómica como tal previa diferenciación de *M. bovis*, realizada por nuestro equipo, es relativamente reciente (2003). Diversos autores han estimado que la proporción de tuberculosis por *M. bovis*/*M. caprae* en países en vías de desarrollo puede rondar el 10-15%, mientras que en los países industrializados esta cifra podría disminuir hasta el 0.46-7.25 (Ashford et al., 2001a; Cosivi et al., 1998).

La lucha frente a esta enfermedad siempre ha estado plagada de dificultades, y desde el punto de vista terapéutico tuvieron que pasar más de 60 años desde el aislamiento del bacilo tuberculoso hasta el descubrimiento de los primeros productos con actividad frente al mismo aptos para su uso clínico. El primero de ellos, la estreptomina, fue descubierto por el doctor Waksman en 1944 (Jones et al., 1944). Tras ella vinieron el ácido para-aminosalicílico, los thiosemicarbazonas, la isoniazida y la pirazinamida. Los antiguos tratamientos, consistentes en combinaciones de varios de estos productos con posologías de hasta cuatro tomas al día durante cuatro años (para un total de 3000 dosis) fueron modificados con el advenimiento de la rifampicina en 1969, que permitió el establecimiento de tratamientos de duración inferior al año. En lo que hace referencia al reservorio animal, el sector veterinario demostró su responsabilidad en el escenario de la lucha frente a la enfermedad al cesar en la utilización de antibióticos de uso humano como la isoniazida en el ganado (Romero et al., 2006).

Además de la búsqueda de drogas frente al bacilo tuberculoso, la posibilidad de cultivar éste en el laboratorio permitió el desarrollo de investigaciones destinadas a la producción de una vacuna basándose en un proceso de atenuación de la cepa virulenta. Aunque las primeras investigaciones no llevaron al descubrimiento de una vacuna de estas características, sí pusieron en evidencia la mayor capacidad inmunogénica de la administración de bacilos atenuados vivos frente a la de bacilos muertos, y que era necesaria una cierta

virulencia residual de la cepa vacunal para permitir la replicación bacteriana en los tejidos. Cincuenta años más tarde Dubos concluyó que “es notable y al mismo tiempo humillante que haya tan poco que modificar o que añadir a estas conclusiones hoy” (DUBOS and HIRSCH, 1954); por desgracia, una afirmación parecida podría hacerse en la actualidad. A mediados del siglo XX se descubrió por fin la que sería a la postre otra herramienta de gran importancia en la lucha frente a la tuberculosis, la vacuna basada en el bacilo de Calmette y Guérin (BCG). Este bacilo, procedente de la realización de numerosos sub-cultivos de una cepa de origen bovino, fue usada por primera vez en 1921, pero su aplicación posterior fue muy limitada debido a las dudas existentes sobre la estabilidad de su atenuación.

Respuesta inmune frente a la tuberculosis

Aproximadamente el 90% de los humanos que se infectan con *M. tuberculosis* desarrollan una respuesta inmune que es capaz de controlar la progresión de la infección pero que es incapaz de eliminar al patógeno, provocándose una fase de latencia que puede persistir de por vida o finalizar debido a una reactivación, provocando la progresión de la enfermedad. Respecto a las personas infectados con *M. bovis* que desarrollan una respuesta inmune efectiva, se desconoce la proporción exacta, ya que no existen tantos estudios detallados como ocurre con *M. tuberculosis*. En cambio, en ganado bovino sí se ha podido observar que *M. tuberculosis* es menos virulento para esta especie y, de hecho, estudios similares son los que podrían determinar los factores exactos responsables de estas diferencias en la virulencia según la especie animal.

Debido a la patogenia de la enfermedad, es importante aclarar los conceptos de individuo infectado y enfermo. Un individuo infectado es aquel que ha estado en contacto con micobacterias incluidas en el complejo *M. tuberculosis* y cuyo sistema inmune ha permitido controlar la progresión de la bacteria aunque no eliminarla totalmente del organismo (encontrándose en un estado de latencia). El individuo enfermo es aquel que presenta sintomatología y lesiones compatibles con la tuberculosis debido a la proliferación de la bacteria por una incapacidad del sistema inmune para contenerla y, por lo tanto, está excretando el bacilo y puede transmitir la infección a otros individuos. La reacción a las pruebas de diagnóstico indica infección y no necesariamente enfermedad, aunque, a veces, tanto los individuos infectados como los enfermos pueden no reaccionar a las pruebas diagnósticas.

Salvo contadas excepciones, la infección natural por *M. tuberculosis*/*M.*

bovis se suele producir por vía aerógena mediante aerosoles que contienen la bacteria. Una prueba a este respecto podría ser que, en la mayoría de los animales en que se detectan granulomas tuberculosos, estos aparecen en los linfonodos del aparato respiratorio (bronquiales, mediastínicos y retrofaríngeos) o en pulmón (Daniel et al., 2009; Sharpe et al., 2010). Sin embargo, en ganado bovino algunos autores han sugerido que la localización del patrón de lesiones no es indicativo de la vía de infección (Palmer et al., 2004). La virulencia de las cepas depende de una serie de complejas interacciones entre los microorganismos y el hospedador (Collins, 2001). Los bacilos expresan factores de virulencia, algunos de ellos asociados a los lípidos de la pared celular, que le permiten sortear las defensas del hospedador, multiplicándose en el punto de entrada antes de su diseminación a otros órganos. Cuanto más virulenta sea una cepa, mayor capacidad tendrá para mantener su crecimiento en los órganos diana antes de que los mecanismos de defensa inmunitarios puedan ser efectivos. La dosis de infección puede afectar a la distribución y severidad de las lesiones. La dosis mínima de infección depende en gran medida de la ruta de infección. En numerosos estudios realizados en cobayas la infección por vía oral requiere dosis infectivas muy superiores a las requeridas en la infección mediante aerosoles. De hecho, en diferentes estudios ha podido establecerse que dosis muy bajas (1-5 bacilos) pueden producir infección vía respiratoria (Johnson et al., 2006b; Neill et al., 1991), mientras que pueden ser necesarios del orden de 10^6 - 10^7 bacilos para producir la infección por vía oral (Francis, 1958).

Una vez superadas las barreras iniciales de defensa, la infección puede transcurrir en dos fases: un periodo primario y un periodo secundario (periodo de diseminación post-primario). La tuberculosis primaria comprende la lesión inicial en el órgano que actúa como puerta de entrada siendo éste el foco primario (Ej. pulmón en caso de infección por vía respiratoria). Posteriormente, los bacilos son transportados por los macrófagos vía linfática a los linfonodos regionales donde la infección puede ser contenida u originarse nuevas lesiones. El conjunto de lesiones en el órgano de entrada y linfonodos regionales constituye el denominado complejo primario (Ej. lesiones tuberculosas en pulmón y linfonodos bronquiales y/o mediastínicos). Este complejo primario puede evolucionar hacia la curación, la latencia o, en algunos casos, se produce una generalización precoz, diseminándose la bacteria por vía linfática y sanguínea, dando lugar a la denominada tuberculosis miliar, caracterizada por lesiones granulomatosas en las membranas serosas. En el caso de que la infección en el órgano de entrada queda resuelta sin formación de lesiones pero se produce lesión en los linfonodos regionales se denomina complejo primario incompleto.

El periodo secundario (periodo de diseminación post-primario) se produce como consecuencia de una segunda infección o por la reactivación de una tuberculosis latente. En este caso, el proceso no se propaga por vía linfática sino por vía canalicular. De esta forma, los linfonodos regionales no están afectados y las lesiones quedan limitadas al órgano afectado. Finalmente, puede desencadenarse el periodo de ruptura, debido a una generalización tardía por vía linfática y hemática dando lugar a caseificación de los tejidos e incluso de los vasos sanguíneos de diversos órganos.

Dentro del complejo *M. tuberculosis*, la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* es la más estudiada. Es una respuesta compleja que incluye tanto mecanismos innatos como adaptativos. La respuesta inmune de base celular (CMI) mediada por linfocitos T es la más importante en el caso de la tuberculosis y la que se establece con mayor intensidad en las primeras fases de la enfermedad (Palmer and Waters, 2006; Pollock and Neill, 2002; Pollock et al., 2006; Schiller et al., 2010). Además, también existe producción de anticuerpos, aunque en términos generales es menos relevante, adquiriendo mayor intensidad en fases avanzadas de la infección, cuando la respuesta de base celular va decayendo. Dosis infectivas altas se relacionan con el desarrollo de la CMI y la rápida aparición de anticuerpos circulantes frente a *M. bovis*. En cambio, dosis bajas provocan una CMI más gradual y una escasa o ausente respuesta de base humoral. La relativa importancia de la respuesta de base humoral desde el punto de vista de la protección frente a la infección se debe a que carácter intracelular de las micobacterias. Actualmente, diversos estudios están demostrando la importancia de los linfocitos B y de los anticuerpos en el desarrollo de una respuesta inmune protectora frente a *M. tuberculosis* (Balu et al., 2011; Encinales et al., 2009; Maglione and Chan, 2009). De hecho, los anticuerpos podrían ser un buen indicador de fenómenos de latencia y tener una papel importante evitando la reactivación de la enfermedad (Encinales et al., 2009). Aún así, la mayor relevancia de la CMI hace que, en aquellos países donde la vacunación se esté considerando como una alternativa en el futuro en animales de producción, las alternativas vacunales probadas estén dirigidas a estimular fundamentalmente este tipo de inmunidad (Buddle et al., 2008; Whelan et al., 2008). De hecho, la CMI de tipo Th1 es la que directamente se relaciona con la protección frente a la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis* y su intensidad, medida por la producción específica de la citoquina interferón-gamma (IFN- γ), se correlaciona directamente con los niveles de protección. Este parámetro es empleado en el diseño de vacunas, buscando antígenos que estimulen al máximo la respuesta Th1 (Buddle et al., 2008).

La población celular más relevante en el primer contacto entre el sistema

inmune innato y la micobacteria es la célula fagocítica, que en el caso de una infección vía aerógena (y una vez superadas las barreras primarias de protección del animal, como las barreras anatómicas o fisiológicas como el pH, temperatura, etc.) es el macrófago alveolar. Este a su vez, forma parte del grupo de las células presentadoras de antígeno (*antigen presenting cells-APCs*). Estas células tratan de fagocitar la bacteria y de destruirla mediante la formación de fagolisosomas. La capacidad para eliminar la bacteria dependerá de factores relacionados con el sistema inmune del animal y de factores de virulencia propios de la bacteria. Como consecuencia de este proceso se puede provocar la destrucción de la micobacteria o bien, esta puede conseguir sobrevivir (evitando la exposición a los componentes inmunológicos extracelulares), multiplicarse y generar la lisis del macrófago alveolar infectado (Ulrichs and Kaufmann, 2003). Cuando esto se produce acuden otras APCs (las células dendríticas y los monocitos), que intentarán de nuevo la fagocitosis de la bacteria.

Estudios previos con *M. tuberculosis* han permitido comprender mejor el reconocimiento antigénico y la fagocitosis de la micobacterias, fenómenos que se realizan mediante diferentes receptores de las APCs. En el reconocimiento inmune hay que destacar el protagonismo de los receptores tipo Toll o TLR (*Toll-like receptors*), un grupo de receptores filogenéticamente conservados e importantes mediadores de la inmunidad innata. En este sentido TLR-2 y TLR-4, en conjunción con el receptor *cluster of differentiation-14* (proteína de membrana CD14) interactúan con componentes de la pared celular de la bacteria como lipoproteínas y el lipoarabinomano (LAM), componente fundamental de la pared celular de las micobacterias (Holland et al., 1998; Juffermans et al., 1998). Otros menos estudiados, como el TLR-9, parecen intervenir en el reconocimiento del ADN bacteriano (Chen and Jondal, 2009). De los TLR cabe mencionar que no están sólo presentes en la superficie de la APC sino que también se encuentran en los fagosomas, por lo que el reconocimiento inmune se produce con o sin fagocitosis previa de la bacteria (Saitoh and Akira, 2010). Los fagosomas formados, como consecuencia del fenómeno de endocitosis, se fusionan posteriormente con lisosomas para constituir fagolisosomas. Los lisosomas son vacuolas que contienen potentes enzimas hidrolíticas cuya actividad óptima se desarrolla a pH ácido. La destrucción de la micobacteria en su interior conlleva la activación de una quinasa asociada al receptor de la interleuquina-1 (*IL-1R-associated kinase-IRAK*) que activa el factor de transcripción NF-Kb (factor nuclear *kappa b*) y provoca la liberación de diferentes citoquinas que favorecen el desarrollo de este proceso en otras células adyacentes. Los fagolisosomas, por tanto, tratan de destruir las micobacterias en el interior de los macrófagos (Raja, 2004) pero estas bacte-

rias poseen mecanismos que tratan de evitar la unión entre el fagosoma y el lisosoma. Por estudios previos, parece ser que determinados lípidos de las micobacterias poseen la capacidad de inhibir esta fusión (Gordon et al., 1980).

Los neutrófilos también acuden al foco de infección por fenómenos de quimiotaxis y también poseen capacidad fagocítica pero, a diferencia de los macrófagos, contienen las enzimas líticas en gránulos (no en lisosomas) que son los que se unen posteriormente con los fagosomas (Johnson et al., 2006a; Korbel et al., 2008). Las células asesinas naturales (NK) son células efectoras del sistema inmune innato. Estas células son capaces de lisis directamente el microorganismo o los monocitos/macrófagos infectados. Durante las fases tempranas de la infección las células NK activan a las células fagocíticas. Este fenómeno es primordial ya que, por poner un ejemplo, la reducción de la actividad de las células NK se asocia a tuberculosis MDR (Ratliffe et al., 1994). Además, las células NK activadas por la IL-2 favorecen la actividad bactericida de los macrófagos infectados por especies del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) como respuesta inespecífica. Las células NK son capaces de producir IFN- γ que estimula la acción de los macrófagos (Molloy et al., 1993). Por las conclusiones de diversos estudios parece ser que la menor actividad de las células NK durante la tuberculosis es consecuencia de la enfermedad y no una causa (Nirmala et al., 2001). De hecho, la quimioterapia mediante el empleo de citoquinas que aumentan la actividad de esta población celular se considera actualmente como tratamiento en medicina humana.

La inmunidad innata y la adquirida están estrechamente relacionadas. Los macrófagos y las células dendríticas son fundamentales en el inicio del desarrollo de la respuesta inmune innata y van a jugar un papel fundamental en el desarrollo de la inmunidad adaptativa. La eliminación de las micobacterias del organismo depende fundamentalmente del éxito de la interacción entre las APCs y los linfocitos T (van Crevel et al., 2002). Tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+ están implicados en la respuesta: ambos producen IFN- γ y muestran actividad citolítica frente a las células infectadas por micobacterias. Además, las células T $\gamma\delta$ son también capaces de producir esta citoquina y parecen estar involucradas tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida, aunque sus funciones no han sido completamente dilucidadas (Hope et al., 2004). La intensidad de la CMI se correlaciona directamente con la capacidad protectora de respuesta inmune frente a la tuberculosis. Concretamente la CMI en que intervienen los linfocitos Th1 es la más importante desde el punto de vista de la protección. Esta sub-población de linfocitos se caracteriza por producir citoquinas pro-inflamatorias como el IFN- γ , necesario para incrementar la actividad macrofágica. Los linfocitos Th2 pro-

ducen citoquinas anti-inflamatorias como la IL-4 o la IL-10, que se caracterizan por tener el efecto inverso, reduciendo la actividad de los macrófagos, favoreciendo la evolución hacia una respuesta de tipo humoral y permitiendo que la enfermedad progrese. Es, por tanto, el balance Th1/Th2 el que determina la evolución de la infección (Pollock and Neill, 2002; Pollock et al., 2006; Pollock et al., 2005; Surcel et al., 1994).

Las células Th desempeñan papeles esenciales en la inmunidad celular: (1) determinan la especificidad de la respuesta inmune (qué antígenos son reconocidos), (2) intervienen en la selección de los mecanismos efectores destinados a eliminar al patógeno, (3) ayudan a la proliferación de las células efectoras adecuadas y (4) mejoran las funciones de fagocitos y otras células efectoras.

La presentación de los antígenos de micobacterias previamente procesados por parte de las APCs a los linfocitos T CD4+ tiene lugar a través de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (CMH-II), que se encuentran en la superficie de macrófagos y células dendríticas. Además, también existe una presentación de antígenos a través del CMH-I (presente en todas las células nucleadas) a los linfocitos T CD8+. Esta segunda modalidad de presentación es importante ya que el CMH-II presenta antígenos procesados en el fagosoma mientras que mediante el CMH-I pueden presentarse antígenos que hayan escapado del mismo (Mazzaccaro et al., 1996). Aparte, se han descrito otros mecanismos de presentación de antígenos de micobacterias, pero son menos relevantes (Gercken et al., 1994; Lewinsohn et al., 1998). El proceso de presentación de antígenos es dinámico y está regulado por citoquinas. Las citoquinas pro-inflamatorias favorecen la expresión del CMH mientras que las anti-inflamatorias lo inhiben. Asimismo, las micobacterias pueden modular esta presentación de antígenos en los macrófagos, disminuyéndola en su propio beneficio mediante la estimulación de la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4 o IL-10 (Gercken et al., 1994). Las APCs por su parte, producen citoquinas de tipo Th1 como IL-12, IL-18 o IL-23 con objeto de incrementar la actividad de los linfocitos T. La respuesta inmune protectora será aquella en que las APCs induzcan la maduración de los linfocitos hacia una sub-población Th1 productora de citoquinas pro-inflamatorias que favorecerán la actividad macrofágica con objeto de destruir a los bacilos. Si esta respuesta es adecuada, la infección se contendrá, evitando que la bacteria se multiplique y la enfermedad progrese. En estos casos la bacteria quedará en estado latente, sin multiplicarse y sin ser eliminada al exterior. Llegada una situación de inmunosupresión, la infección podría reactivarse de nuevo haciendo progresar la enfermedad.

Vacunación frente a la tuberculosis

Estamos celebrando el 90 aniversario del comienzo de la aplicación en humanos de la primera y única vacuna frente a la tuberculosis desarrollada y comercializada hasta el momento gracias, como tantas veces en la historia, a las investigaciones y el trabajo durante más de 11 años de un equipo multidisciplinar del Instituto Pasteur de Lille formado por un médico y un veterinario. La vacuna fue elaborada con una cepa atenuada de *M. bovis* por Albert Calmette (médico) y Camille Guerin (veterinario) mediante un proceso ya utilizado por otros investigadores de la época para la atenuación de otros patógenos en el Instituto Pasteur y que consistió en sub-cultivar la bacteria más de 230 veces consecutivas, desde 1908 hasta 1919. El proceso, aunque aparentemente sencillo, requirió gran esfuerzo y supuso un ejemplo de dedicación científica, incluso inmersos en la Primera Guerra Mundial.

Mycobacterium bovis bacilo de Calmette-Guerin (BCG) es una especie incluida dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que se emplea actualmente en la vacunación frente a la tuberculosis debido a que se ha atenuado su virulencia, aunque manteniendo parte de sus propiedades inmunogénicas. Actualmente, es la única vacuna frente a la tuberculosis autorizada para uso en humanos y la OMS recomienda su empleo dentro de los programas de vacunación infantiles en numerosos países. A pesar de que la vacuna BCG se considera efectiva para combatir la tuberculosis en individuos jóvenes (eficacia próxima al 80% en la prevención de la tuberculosis miliar o la meningitis tuberculosa), se ha mostrado poco eficiente frente a la tuberculosis pulmonar en adultos, que actualmente constituye la forma más prevalente. Numerosas pruebas clínicas y estudios de campo han demostrado que la protección conferida por la vacuna varía mucho entre individuos (Sable et al., 2011). En sanidad animal, varios estudios con resultados desiguales han probado las posibilidades terapéuticas de la vacuna BCG en ganado bovino, aunque actualmente su empleo no esté permitido en Europa (Buddle et al., 2011), e incluso en animales salvajes (Aznar et al., 2011; Ballesteros et al., 2009a; Ballesteros et al., 2009b).

La idea de desarrollar una vacuna frente a la tuberculosis humana empleando cepas procedentes de los bovinos está asociada a lo acontecido con la vacuna de la viruela. Tras el éxito de la vacunación frente a la viruela, los científicos comenzaron a plantearse la posibilidad de que la infección por *M. bovis* protegiese frente a la tuberculosis en humanos por *M. tuberculosis*. A finales del siglo XIX se hicieron las primeras pruebas en Italia y obviamente los resultados fueron catastróficos, pues *M. bovis* resultó ser también patógeno

no para los humanos. Una vez demostrada la virulencia de los aislados bovinos, Calmette y Guérin cambiaron la estrategia e iniciaron el laborioso proceso de atenuación que culminaría 13 años más tarde con la aplicación de la vacuna en humanos en 1921. Inicialmente, la nueva vacuna no tuvo buena aceptación por parte de la sociedad debido a incidentes como el que tuvo lugar en Lübeck (Alemania) en 1930, donde 240 recién nacidos de 10 días de edad fueron vacunados, desarrollando la mayor parte tuberculosis y muriendo finalmente 72 de ellos. Más tarde se descubriría que no había sido un problema de la cepa BCG y que la vacuna estaba contaminada con una cepa virulenta que había sido conservada conjuntamente con ella. En 1928 la vacuna BCG fue aceptada por el Comité de Salud de la Liga de las Naciones (predecesor de la OMS) aunque debido a la oposición de diversos sectores no fue aplicada a gran escala hasta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se vacunaron cerca de 8 millones de niños en Europa del Este en el periodo de 1945 a 1948.

Los mecanismos por los que la cepa de *M. bovis* inicialmente patógena se consiguió atenuar dando lugar a la actual cepa BCG se siguen estudiando. Hallazgos recientes han revelado que la cepa vacunal ha perdido más de 100 genes localizados en las Regiones de Diferencia (RD) de su genoma. Algunas de estas regiones están directamente relacionadas con la virulencia, como la RD1, que codifica para la proteína ESAT-6 (6-kDa *early secretory antigenic target*), relacionada directamente con la patogenicidad de la bacteria (Brodin et al., 2005). Sin embargo, no podemos hablar de una cepa única y uniforme de BCG ya que el sub-cultivo de la cepa original de BCG provocó que el proceso de delección continuase. Inicialmente, cada lote de BCG se identificaba con el lugar o el laboratorio de producción seguido del número de pases con el que fue conseguido (Ej. BCG Pasteur 1173). Esto ha permitido determinar que la cepa BCG Tokio o Pasteur son más inmunogénicas que otras como BCG Glaxo o BCG Danish. Las diferentes cepas de BCG pueden contener mutaciones naturales en genes que codifican para factores de virulencia como ESAT-6, *PhoP* o determinados lípidos de la pared y que podrían ser responsables de las diferencias en la protección conferida por la vacuna, de la reactividad al test de intradermoreacción o de las diferentes reacciones adversas provocadas.

- Eficacia vacunal

El aspecto más controvertido de la vacuna BCG es el relacionado con la eficacia variable que ha mostrado en las diferentes pruebas llevadas a cabo en

distintos países, motivado en parte por la falta de uniformidad de las cepas vacunales (Brosch et al., 2007). El primer estudio a gran escala sobre la eficacia de la vacuna BCG se realizó en el Reino Unido entre 1956 y 1963 y comprendió la vacunación de más de 54.000 niños de entre 14 y 15 años de edad. El estudio mostró una eficacia vacunal del 84% hasta un periodo de 5 años tras la inmunización (Hart and Sutherland, 1977b). Sin embargo, un estudio realizado en Georgia y Alabama (Estados Unidos) en 1966 mostró una eficacia de tan solo el 14% (Comstock and Palmer, 1966), provocando reticencias a la aplicación de la vacunación masiva con BCG. La duración del efecto protector conferido por la vacuna BCG tampoco se conoce exactamente. Por una lado existen estudios publicados que calculaban una eficacia del 59% tras 15 años y del 0% tras 20 años y por otro lado existen otros en los cuales de mostraban índices altos de protección hasta 60 años después de la inmunización (Aronson et al., 2004).

Además de las mencionadas, existen otras razones que podrían explicar esta variabilidad en la eficacia de la vacuna BCG, aunque no todas han podido ser demostradas y ninguna puede justificar por sí sola la falta de eficacia de la vacuna en determinados países. Entre las posibles causas de esta variabilidad estarían: (1) la exposición a micobacterias tuberculosas previamente a la vacunación, (2) la variación genética de las poblaciones según las regiones (Packe and Innes, 1988), (3) la interferencia ocasionada por la infección con micobacterias no tuberculosas ambientales (Black et al., 2002; Brandt et al., 2002), (4) la infección concurrente con parásitos u otros agentes que disminuyan la respuesta inmune de base celular (Rook et al., 2005) o (5) la exposición a la luz ultravioleta (Jeevan et al., 2009).

Debido a estas diferencias en la eficacia y las distintas situaciones socio-económicas de los distintos países, los programas de vacunación han sido muy variados. En Estados Unidos nunca ha llegado a aplicarse la vacunación masiva con BCG. En el Reino Unido, se llevó a cabo vacunación masiva entre 1953 y 2005. Se vacunaron todos los recién nacidos de grupos de alto riesgo y a todos los niños de 13 años. También se suministró la vacuna a individuos que habían estado expuestos a la infección. Finalmente, la vacuna se dejó de aplicar rutinariamente debido a la disminución del coste-beneficio. La razón era que en 1953, para prevenir un caso de tuberculosis, debían de ser vacunados 94 niños y en 1988, la incidencia era tan baja que, para prevenir un caso de tuberculosis, se tenía que inmunizar a 12000 niños. India y Pakistán fueron los primeros países fuera de Europa en aplicar la vacunación masiva, comenzando en 1948. En general, en Europa solo se aplicaba la vacuna una sola vez durante toda la vida, aunque ciertos países como la antigua URSS, Korea del Sur,

Taiwan, Malasia o Singapur la aplicaron al nacimiento y los 12 años de edad. Posteriormente, esta estrategia se modificó y pasó a vacunarse una única vez.

En España, se efectuó una amplia campaña de vacunación BCG de recién nacidos y niños escolarizados negativos a la intradermorreacción desde 1965 a 1973, año en que continuó vacunando solo a los recién nacidos. Durante la década de los 80 la vacunación sistemática se fue suspendiendo en todas las provincias españolas, debido principalmente a la baja prevalencia de la enfermedad y la interferencia diagnóstica que provocaba, salvo en el País Vasco, dónde se continúa vacunando.

Actualmente, la OMS recomienda la aplicación de la vacuna BCG en países donde la tuberculosis es endémica, ya que protege frente a la tuberculosis miliar y la meningitis tuberculosa (Datos de la OMS, 2004).

En cuanto a la aplicación, la vacunación se inyecta en posición intradérmica en la región deltoidea. La inoculación sub-cutánea puede originar abscesos que requieran el uso de antibióticos para su tratamiento. Hay que destacar que, excepto en neonatos, la vacuna debe administrarse posteriormente a la realización de un test de Mantoux, ya que en caso de reacción positiva a dicha prueba no se recomienda la vacunación. En estos casos, es necesario asegurarse que el paciente no posee una tuberculosis activa.

- Nuevos tipos de vacunas

Hace ya más de 10 años, los investigadores hablaron de la posibilidad de desarrollar una nueva vacuna. Asumiendo que tan solo tuviese un 50% de eficacia podría prevenir 9 millones de muertes antes del año 2030 (Murray and Salomon, 1998a; Murray and Salomon, 1998b). Actualmente, esta predicción, podría cumplirse, y se espera la comercialización de una nueva vacuna antes del año 2020. En vista de estos datos, los objetivos de reducir la prevalencia y la mortalidad de la tuberculosis a la mitad hacia el año 2015 (en comparación con los datos de 1990) y de erradicar la tuberculosis (incidencia inferior a un nuevo caso por cada millón de habitantes) para el año 2050 resultan, aunque difíciles, alcanzables si se siguen destinando suficientes recursos a la investigación (Kaufmann, 2011).

La mejora de las vacunas atenuadas se ha visto en ocasiones limitada por la ausencia de herramientas de manipulación genética de las micobacterias. Estudios pioneros en Europa y Estados Unidos realizados por Brigitte Gicquel

y William Jacobs respectivamente permitieron poner a punto las herramientas de las que se dispone actualmente para la modificación genética de las micobacterias. Con objeto de crear esas cepas atenuadas estables se han probado mutaciones fundamentalmente en RD1, como las que afectan a los genes *panCD*, *lysA* o *secA*, involucrados en el metabolismo del pantotenato, de la lisina y en la supervivencia de *M. tuberculosis* respectivamente.

Si en el año 2001 apenas existían unas pocas vacunas desarrolladas y en fase pre-clínica, actualmente existen al menos 12 vacunas candidatas que se encuentran en diferentes fases de las pruebas clínicas. Casi todas ellas tienen como objetivo prevenir la tuberculosis activa, aunque no evitan la infección. El resto, son vacunas terapéuticas que pueden ser empleadas conjuntamente con la quimioterapia administrada en individuos co-infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cardona and Amat, 2006; von Reyn et al., 2010). De todas estas nuevas vacunas, solo aquellas que superen en eficacia y seguridad a la vacuna BCG serán consideradas para la comercialización. En este proceso, las pruebas clínicas en animales juegan un papel muy importante, especialmente para el estudio de diferentes bio-marcadores, aunque probablemente en estos estudios no puede predecirse la eficacia final de la vacuna en humanos (Kaufmann, 2011). La evaluación de la eficacia y la seguridad de las nuevas vacunas es uno de los grandes temas pendientes. Para ello se han desarrollado varios modelos animales, la mayoría de los cuales se basan en el ratón, a pesar de que esta especie tiene cierta tolerancia a la infección y plantean ciertos problemas a la hora de validar los experimentos. Sin embargo, su disponibilidad y facilidad de manejo, hace que se esté implantando sobre otros modelos tampoco exentos de problemas como el cobaya. Por otra lado, antes de proceder al empleo de vacunas en humanos, y a pesar de los conflictos éticos que plantea, se han tenido que desarrollar estudios en primates debido a la mayor similitud desde el punto de vista fisiológico con los humanos. Una vez más en el campo de la tuberculosis, la colaboración y la formación de equipos multidisciplinares está siendo exitoso.

La vía de administración de la dosis infectiva y de la vacuna en los modelos experimentales son factores que condicionan notablemente los resultados de los estudios. En principio la vía de infección más frecuente es la aerógena. La vía intravenosa, sin embargo, induce una inmunidad más rápida basada esencialmente en la producción de una respuesta de tipo Th1, es decir, con actividad de las células T CD4+ capaces de producir IFN- γ y de macrófagos.

Existen tres escenarios en cuanto a la vacunación frente a la tuberculosis que pueden contribuir a erradicar la tuberculosis para el año 2050, incluido

dentro de los Objetivos de Desarrollo del Milenio: (1) el desarrollo de una vacuna de subunidades que incremente la inmunidad en individuos previamente vacunados con BCG, (2), el desarrollo de una vacuna que pueda sustituir a la BCG y que requiera una única dosis aplicada en neonatos y, finalmente, (3) la combinación de la anterior con una vacuna de subunidades. Para conseguir el objetivo, es esencial seguir combinando las pruebas clínicas con el trabajo de investigación en el laboratorio para la búsqueda de nuevos compuestos que puedan llegar a convertirse en la futura vacuna frente a la tuberculosis.

Como se ha comentado anteriormente, idealmente, las nuevas vacunas deben superar en seguridad y eficacia a la vacuna BCG, es decir, deben ser seguras en individuos infectados con VIH e inducir protección tanto en jóvenes como en adultos. En las alternativas en las que se trabaja existen vacunas cuyo objetivo es sustituir a las vacuna BCG y otras que serían adecuadas para administrar conjuntamente con la vacuna BCG con objeto de potenciar sus efectos. Las vacunas destinadas a sustituir a la vacuna BCG actual se basan principalmente en el empleo de cepas genéticamente modificadas de *M. bovis* BCG que sobre-expresan ciertos antígenos altamente inmunógenos (por ejemplo, rBCG30 sobre-expresando el antígeno85B) o ciertas moléculas que alteran la respuesta inmune (por ejemplo, VPM1002 sobre-expresando listeriolisina) o basadas en cepas de *M. tuberculosis* que han sido previamente atenuadas mediante la eliminación de uno o más genes de que codifican para factores de virulencia (por ejemplo, el mutante *phoP* SO2, que se encuentra en fase preclínica de evaluación). Estas vacunas, estimulan en general la respuesta inmune de base celular, en especial las células Th1 (CD4 y CD8) y más en particular una sub-población productora de IL-17, citoquina que estimula la actividad de los neutrófilos (Checkley and McShane, 2011; Kaufmann, 2011). También existen vacunas inactivadas en desarrollo. Un ejemplo es la vacuna RUTI, que se compone de bacilos de *M. tuberculosis* formulados en liposomas y previamente fragmentados e inactivados por calor. Entre los objetivos de esta vacuna está el de reducir la duración de la quimioterapia para los casos de infección latente por *M. tuberculosis* (Vilaplana and Cardona, 2010).

Todos estos trabajos han sido pioneros y han permitido a diferentes grupos de investigación europeos y americanos trabajar con éxito en el desarrollo de nuevas vacunas. Esto ha permitido tener actualmente alguna vacuna experimental en fase clínica III, como la resultante de la colaboración entre la Universidad de Zaragoza y el Instituto Pasteur se ha desarrollado una nueva vacuna experimental a partir del estudio de cepas de *M. tuberculosis* altamente virulentas debido, entre otros factores, a su resistencia a los antimicrobia-

nos. En estos estudios se observó que el gen *phoP* se expresaba significativamente en estas cepas, por lo que se pensó que su inactivación reduciría también notablemente su virulencia. Actualmente se conoce que *phoP* está implicado en la regulación del 2% de los genes responsables de la virulencia de *M. tuberculosis*. Estudios llevados a cabo en ratón empleando mutantes de *M. tuberculosis* en el gen *phoP* han mostrado resultados prometedores respecto a su empleo en la vacunación, pues han aportado mayor protección que la vacuna BCG (Martin and Gicquel, 2011). Esta vacuna será comercializada con toda seguridad por un laboratorio español experto en la fabricación de vacunas animales.

Por otra lado, las vacunas de subunidades constan de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* y pueden estar basadas en el uso de vectores (virus) o de adyuvantes. Las primeras se caracterizan por emplear como vectores virus muy inmunógenos incapaces de replicarse (por ejemplo, las vacunas MVA85A o AERAS-402/Crucell Ad35). Las segundas, en lugar de emplear un vector viral para estimular la inmunidad, emplean adyuvantes, que se administran conjuntamente con las proteínas (por ejemplo, la vacuna GlaxoSmithKline's M72) con la idea de potenciar el efecto de la BCG o permitir su aplicación en personas inmunodeprimidas (Kaufmann, 2011).

En el proceso de desarrollo y validación de vacunas frente a la tuberculosis se emplean diversos marcadores que puedan correlacionarse con la inducción de una respuesta inmune protectora. En este caso, uno de los marcadores más empleados es la producción de IFN- γ , pues se ha demostrado un incremento significativo de la susceptibilidad a la infección en situaciones en las que se produce una depleción de la población de los linfocitos T CD4 (por ejemplo, en la infección por VIH), principal población productora de IFN- γ . Otros componentes del sistema inmune que pueden actuar como indicadores de la eficacia vacunal son los linfocitos T memoria, linfocitos T productores de IL-17, linfocitos T con función reguladora o los linfocitos T CD8 y otros componentes del sistema inmune innato como la actividad de macrófagos y células dendríticas (Walzl et al., 2011).

• Vacunación frente a la tuberculosis en animales

M. bovis es el principal agente etiológico de la tuberculosis en el ganado bovino, aunque puede afectar a un amplio rango de hospedadores entre los que se incluye el hombre. Por otro lado, *M. tuberculosis*, principal causante de la tuberculosis en humanos también se ha aislado en animales. Se ha estima-

do que alrededor de 50 millones de cabezas de ganado bovino están infectados de tuberculosis en todo el mundo, lo que origina unas elevadas pérdidas económicas. En muchos de estos países existe fauna salvaje que puede actuar como reservorio de la infección, pudiendo transmitirla al ganado bovino y a otras especies domésticas, dificultando la erradicación en determinadas regiones. Ante esta problemática y a pesar de que hasta la fecha la vacunación frente a la tuberculosis no está autorizada para el control de la infección en Europa, algunos investigadores han centrado sus estudios en el funcionamiento de las vacunas disponibles en animales domésticos (principalmente ganado bovino) e incluso en los reservorios salvajes. Entre los principales inconvenientes que se plantean con el uso de estas vacunas, especialmente en animales domésticos, están su eficacia variable y la interferencia que origina su administración con el diagnóstico de la enfermedad mediante las pruebas de base celular disponibles actualmente (Buddle et al., 2011).

En ganado bovino se han realizado multitud de estudios probando la eficacia de diferentes vacunas. Respecto la vacuna BCG, se ha probado principalmente en animales infectados experimentalmente, pero apenas existen estudios con infección natural. En animales infectados experimentalmente ha demostrado relativa eficacia, pues aunque, en general, no evita la infección, sí disminuye la patología ocasionada, la cual se relaciona directamente con la excreción de la bacteria y la transmisión de la infección. En animales infectados de forma natural, un estudio reciente mostró que la vacunación con BCG disminuía el número de animales que se infectaban durante un periodo de 12 meses tras su aplicación (Lopez-Valencia et al., 2010). También se ha probado en ganado el empleo de combinado de la vacuna BCG con vacunas vectoriales como MVA85A o Ad85A, observándose una mayor protección que empleando únicamente BCG, disminuyendo tanto la carga bacteriana como el grado de las lesiones (Vordermeier et al., 2009). En cuanto a la protección conferida por las vacunas atenuadas elaboradas a partir de especies del complejo *M. tuberculosis* se han obtenido resultados dispares. En un estudio en el que se empleó para vacunar un *M. bovis* modificado (auxótrofo de leucina) se detectaron buenos índices de protección (Khare et al., 2007). En cambio, el empleo de mutantes de *M. tuberculosis* para la vacunación en terneros no ha mostrado buenos resultados en cuanto a protección frente a la infección experimental con *M. bovis* (Waters et al., 2007). En cuanto a las vacunas de ADN, diversas pruebas han demostrado que su empleo conjunto con BCG para potencia la respuesta inmune mejora la protección respecto a cuándo se emplea únicamente BCG (Cai et al., 2006; Maue et al., 2007; Skinner et al., 2003).

Respecto al uso de vacunas frente a la tuberculosis en fauna salvaje, exis-

ten ciertos aspectos que hay que diferenciar y que afectan a los estudios realizados. En primer lugar, en estas especies, la posible interferencia con el diagnóstico no es tan importante, puesto que no suele realizarse de manera rutinaria y, en segundo lugar, han de buscarse alternativas que no sean costosas y con vías de administración diferentes que eviten tener que capturar a los animales. por esta razón, al BCG se ha planteado como una buena opción para la vacunación de fauna salvaje y ya ha sido probada en especies como la zari-güeya, el tejón, el jabalí, el ciervo, el hurón o el búfalo. La vía de administración que más se ha ensayado en estas especies es la oral, mediante la elaboración de cebos conteniendo la vacuna, aunque también se han realizado vacunaciones vía intranasal-conjuntival, subcutánea o intramuscular (Buddle et al., 2011). Los resultados hasta la fecha han sido dispares y, aunque la mayor parte se han obtenido de animales infectados experimentalmente, parecen mostrar una mejor protección en casos de infección natural y que se manifiesta principalmente mediante una reducción de la severidad de la lesiones (Tompkins et al., 2009).

• Objetivos futuros

La investigación sobre vacunas frente a la tuberculosis ha conseguido grandes avances en la última década, aunque todavía quedan grandes retos por conseguir. Un tercio de la población mundial está infectada de tuberculosis y la investigación en las denominadas vacunas terapéuticas y en antibióticos ha permitido, entre otras cosas, reducir las duración de los tratamientos. Otro objetivo de las investigaciones en este campo es la protección de los individuos ya vacunados. En este sentido, pruebas recientes con vacunas de subunidades en animales previamente vacunados con BCG están dando buenos resultados. En cuanto a las vacunas vivas atenuadas mediante la inactivación de genes de virulencia, se están erigiendo como buenas alternativas para la vacunación debido a su efectividad y bajos costes de producción. Tras casi 100 años desde el desarrollo de la vacuna BCG, existen más de doce vacunas preventivas candidatas con buenos resultados que se encuentran en fase de prueba en humanos o en fase pre-clínica. El desarrollo de una nueva vacuna que confiera índices de protección elevados es un reto para todas las comunidades científicas que se planteen, con un bajo coste, la erradicación de la tuberculosis a medio plazo y la sustitución a largo plazo de la actual vacuna BCG.

EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM AVIUM*

El complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*, MAC) comprende, a diferencia del complejo *M. tuberculosis*, especies con un mayor grado de divergencia genética y que presentan importantes diferencias fenotípicas entre ellas. Las características más sobresalientes comunes a todos sus miembros son su ácido-alcohol resistencia, el crecimiento lento y la producción de un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied et al., 1993). Tradicionalmente este complejo agrupaba dos especies, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, que no podían ser diferenciadas mediante técnicas bioquímicas o por su comportamiento en el cultivo *in vitro* (Meissner et al., 1974). En un primer momento se agrupó también la especie *Mycobacterium scrofulaceum* dentro de este complejo (llamado entonces MAIS), si bien posteriormente quedó establecido de forma inequívoca que dicha especie no tiene una relación con *M. avium* o *M. intracellulare* que lo justifique, por lo que ya no se acepta como miembro de MAC.

Schaefer y colaboradores desarrollaron en 1965 un sistema de seroaglutinación, realizada con células completas y suero policlonal obtenido en conejos, que permitía dividir el complejo en 15 serovares (Schaefer, 1965). Los serovares 1 y 2 fueron definidos en un principio como *M. avium*, ya que las cepas pertenecientes a éstos eran virulentas al ser inoculadas en pollos. Poco después se añadió un nuevo serovar de cepas virulentas, el número 3 (Marks et al., 1969). Los serovares 4-6 y 8-11 se denominaron MAC “intermedios”, pues solo producían lesiones locales en los puntos de inoculación al ser inyectados en pollos. El resto de serovares, totalmente avirulentos para los pollos, se consideraron propios de *M. intracellulare*. El número de serovares pertenecientes a *M. intracellulare* fue aumentando (Wolinsky, 1979), siendo la

naturaleza de alguno de estos serovares difícil de determinar. A principios de los 90 se consideró de forma unánime que los serovares 1-6, 8-11 y 21 eran propios de *M. avium*, mientras que el 7, 12-20, 23 y 25 se adjudicaban a *M. intracellulare*; la especie dominante de otros serovares (21, 24, 26 y 28) es sin embargo difícil de precisar (Saito et al., 1990; Wayne et al., 1993).

El rápido avance en el conocimiento de la genética micobacteriana permitió la diferenciación de estas dos especies mediante técnicas moleculares más fácilmente reproducibles (Rogall et al., 1990). Al observar las propiedades fenotípicas de los distintos aislados que quedaban englobados en la especie *M. avium* se observó que había una gran heterogeneidad: todas estas cepas presentaban una similitud de más del 90% al realizar técnicas de hibridación ADN-ADN, lo que parecía indicar que pertenecen a una misma especie bacteriana (Saxegaard and Baess, 1988; Saxegaard et al., 1988), si bien exhibían marcadas diferencias en lo referente a su patogenicidad, su velocidad y requerimientos de cultivo *in vitro* y su preferencia de hospedador. Un estudio detallado de estas características fenotípicas y un análisis de ADN mediante restricciones enzimáticas permitió finalmente la subdivisión de la especie *M. avium* en varias subespecies. Así, en 1990 se establecieron tres subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) y *M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel et al., 1990). En el año 2002 se definió una nueva especie, *M. avium* subsp. *hominissuis*, que agrupaba las cepas pertenecientes a *M. avium* subsp. *avium* aisladas con mayor frecuencia de hospedadores humanos y porcinos y del medio ambiente, y que tenían unas características fenotípicas y genotípicas diferentes de los aislados de aves (o “bird-type”) (Mijs et al., 2002).

Pero, además de las especies enumeradas hasta ahora, se ha definido un complejo grupo de aislados que, si bien son clasificados como MAC por algunas técnicas [como las sondas comerciales de ADN Accu-Probe (Gen-Probe, California, EEUU)], no pueden ser asignados de forma inequívoca a ninguna especie. Este grupo, que fue llamado *cluster X*, “no específico” o MAIX (Viljanen et al., 1993) ha sido objeto de varios estudios mediante distintas técnicas de biología molecular en los últimos 20 años, especulándose con la posibilidad de que contuviera nuevas especies de micobacterias (Frothingham and Wilson, 1993; Frothingham and Wilson, 1994; Rogall et al., 1990; Soini et al., 1996; Viljanen et al., 1993). Ha sido en la última década cuando, merced al progresivo conocimiento del *cluster X*, se han definido dos nuevas especies: *M. chimaera* (Tortoli et al., 2004) y *M. colombiense* (Murcia et al., 2006).

Antes de entrar a describir con mayor detenimiento cada una de las espe-

cies y subespecies mencionadas anteriormente, conviene destacar una vez más la grandísima variabilidad genética que se ha ido describiendo en el último cuarto de siglo dentro del complejo *M. avium*. En este sentido, la heterogeneidad genética de MAC se asemeja más a la observada en *E. coli* que a la de *M. tuberculosis* (Turenne et al., 2007). Por tanto, seguir describiendo aislados clínicos como pertenecientes a MAC o incluso como *M. avium* resulta del todo inadecuado ya que, aunque el tratamiento antibiótico para todas las especies de MAC es similar (Beggs et al., 2000), supone prescindir de una información necesaria a la hora de valorar las conclusiones de los trabajos de investigación. El hecho de que tradicionalmente no se estableciera la subespecie de *M. avium* de la que se hablaba mediante serotipificación o análisis de ADN en numerosos estudios hace que sea difícil interpretar sus resultados a posteriori, lo que redundaría en una pérdida de información muy valiosa.

Mycobacterium intracellulare

A pesar de haber sido definida como especie distinta de *M. avium* en 1967 (Runyon, 1967), ha sido objeto menos estudiada que las subespecies de la anterior. La dificultad para diferenciar las dos especies de MAC mediante pruebas de cultivo o bioquímicas ha hecho que tradicionalmente se definieran muchos aislados como “pertenecientes al complejo *M. avium-intracellulare*”, haciendo difícil la interpretación de los resultados en función de la especie. El desarrollo de sondas de ADN específicas para cada una de ellas hizo mucho más simple la identificación, aunque hay aislados que pueden no reaccionar a ninguna de ellas, complicando la valoración de los resultados (Saito et al., 1990). En la actualidad todavía hay muchos trabajos que identifican sus aislados como pertenecientes a MAC, ya que los sistemas comerciales son caros, y el tratamiento es el mismo para todas las infecciones (Beggs et al., 2000). La cepa tipo de esta especie, ATCC 13950, procede de un niño fallecido por una infección diseminada (Cuttino and McCABE, 1949).

A pesar de la similitud fenotípica con *M. avium*, el estudio de su ADN ha revelado diferencias significativas en casi todas las dianas moleculares estudiadas, mostrando además una considerable variabilidad intraespecífica (ver caracterización molecular del complejo *avium*, págs. 59-86). No se han detectado secuencias de inserción específicas de esta especie, aunque en ocasiones sí se han obtenido resultados positivos empleando sondas para la detección de elementos propios de *M. avium* como IS1245 (Beggs et al., 2000; Keller et al., 2002).

Se han identificado aislados de *M. intracellulare* de varias especies ani-

males, tanto domésticas como salvajes, en ocasiones causando procesos clínicos graves (Fleischman et al., 1982; Moore et al., 1971; Oloya et al., 2007; Ritacco et al., 1998; Schrenzel et al., 2008); (Machackova et al., 2003), aunque no es un patógeno habitual en veterinaria, y su virulencia en aves es muy inferior a la de *M. avium* (Tell et al., 2001). En humanos es un patógeno relevante, capaz de provocar cuadros clínicos similares a los de *M. avium* subsp. *hominissuis*; curiosamente, parece afectar en menor medida a los pacientes infectados de VIH que ésta subespecie (Beggs et al., 2000; Guthertz et al., 1989; Wayne and Sramek, 1992), si bien esto puede representar diferencias en la distribución geográfica de los aislados (Inderlied et al., 1993). Al igual que en el caso de *M. avium*, la fuente de infección puede ser ambiental, ya que esta micobacteria ha sido aislada repetidas veces a partir de muestras de agua en distintas localizaciones (Aronson et al., 1999; Covert et al., 1999; Le Dantec C. et al., 2002; Pryor et al., 2004; Vaerewijck et al., 2005) y puede resistir la cloración (Falkinham, III, 2003a).

Mycobacterium avium* subsp. *avium

Es la especie causal de la tuberculosis aviar, aunque también puede infectar otras especies animales, incluyendo el hombre. La cepa tipo es la ATCC 25291, aislada de una gallina. Los aislados que pertenecen a esta especie eran llamados anteriormente “de tipo aviar” (“bird-type”). A diferencia de *M. avium* subsp. *hominissuis*, todas las cepas de esta especie muestran un genotipo y un fenotipo bastante homogéneo. Así, todas pertenecen a los serovares 1, 2 ó 3 (Pavlik et al., 2000; Ritacco et al., 1998) y son virulentas si se inyectan en pollos; crecen en medios con huevo, no necesitan el aporte exógeno de micobactina para su crecimiento *in vitro* y el pH ácido no estimula su crecimiento; y no crecen a 24°C ni a 45°C. Al ser una micobacteria de crecimiento lento, requiere 3-4 semanas para dar lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos.

En cuanto a su genotipo, uno de los rasgos más característicos es la presentación de más de dos copias de la secuencia de inserción IS901 (pág. 71), que se considera específica de esta subespecie (Kunze et al., 1992; Kunze et al., 1991; Pavlik et al., 2000). Tradicionalmente se consideraba que poseía tres copias de IS1245, lo que daba lugar al “perfil aviar” al realizar RFLP-IS1245 (Bono et al., 1995; Ritacco et al., 1998), pero recientemente se demostró que ese perfil era producto de hibridaciones cruzadas con IS1311 (IS1311, pág. 69), de modo que ha quedado establecido que en realidad posee una copia de IS1245 y dos de IS1311 (Johansen et al., 2005).

Es una bacteria de indudable interés veterinario: en primer lugar, es el agente causal de la tuberculosis aviar, enfermedad infecciosa transmisible que puede originar cuantiosas pérdidas económicas; esta patología es ahora poco importante en grandes industrias de producción avícola gracias a los programas de prevención (Gill and Blandy, 1986; Radkowski et al., 1996), pero sigue siendo relevante en zoológicos y otras agrupaciones de aves silvestres cautivas (Dvorska et al., 2007; Schrenzel et al., 2008), y en pequeños aviarios (Shitaye et al., 2008), estando incluida en la antigua lista B de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Esta enfermedad está distribuida por todo el mundo, aunque parecen existir regiones o poblaciones en la que es enzoótica (Juan et al., 1996) y otras donde es muy infrecuente, como Japón (Morita et al., 1994; Sato et al., 1996). La tuberculosis aviar afecta a numerosas especies de aves, si bien no todas las especies muestran la misma susceptibilidad, siendo la enfermedad más prevalente en pollos y aves salvajes criadas en cautividad, mientras que patos y gansos parecen más resistentes (Hejlicek and Trembl, 1995). Además, es especialmente preocupante en especies amenazadas o en peligro de extinción (rapaces). De cualquier forma, la susceptibilidad de las aves a la infección por *M. avium* subsp. *avium* se ve muy influida por otros factores predisponentes, fundamentalmente los que provocan estrés en los animales (Tell et al., 2001). El diagnóstico *in vivo* se ve complicado por el hecho de que los animales enfermos pueden no mostrar signos clínicos, o mostrar un cuadro inespecífico y muy variable hasta que la enfermedad está muy avanzada (Tell et al., 2001). La tuberculinización cutánea ha sido una herramienta útil en el saneamiento de explotaciones avícolas (Pavlas, 1981; Thorel et al., 1997), aunque su utilidad es menor en otras especies. Otra alternativa diagnóstica es el test de aglutinación en sangre para la detección de anticuerpos, que aunque no es 100% sensible es al menos tan fiable como la tuberculinización (Thorel et al., 1997). La vía de adquisición de la enfermedad es fundamentalmente la fecal-oral, y por ello las lesiones granulomatosas aparecen en primer lugar en el tracto intestinal, y seguidamente en hígado y bazo (Tell et al., 2001; Thorel et al., 1997).

Aunque las aves constituyen su hospedador preferente, esta bacteria también se ha aislado de un amplio rango de mamíferos: así, se ha aislado *M. avium* subsp. *avium* a partir de muestras procedentes de ciervos y ovejas (Ritacco et al., 1998), vacas (de Lisle et al., 1998; Dvorska et al., 2004; Ocepek et al., 2003), roedores (Fischer et al., 2000), cerdos (Bauer et al., 1999; Komijn et al., 1999; Mobius et al., 2006; Oliveira et al., 2003; Ritacco et al., 1998; Thegerstrom et al., 2005), humanos (Kumar et al., 2006; Legrand et al., 2000; Novi et al., 2000; Picardeau et al., 1997) (si bien en muchos casos solo se identifican los aislados por RFLP-IS1245) e incluso muestras ambien-

tales (Dvorska et al., 2002; Fischer et al., 2003; Fischer et al., 2004). No obstante, en lo que hace referencia a las muestras ambientales, humanas y porcinas, en la mayoría de los casos el porcentaje de aislados de *M. avium* subsp. *avium* cultivados es muy inferior al de *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis

Esta subespecie bacteriana, de muy reciente definición, se diferencia de *M. avium* subsp. *avium* por sus características fenotípicas (es capaz de crecer en un rango más amplio de temperaturas, entre 24 y 45°C) y genotípicas (secuencia de ITS – *Internal Transcribed Spacer*, ver pág. 61 – variable, perfil de RFLP-IS1245 multibanda) (Mijs et al., 2002). Estas bacterias están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, que puede constituir una fuente de infección para humanos (Primm et al., 2004) y animales (Matlova et al., 2004).

Es sin duda la subespecie más heterogénea de *M. avium*, ya que la aplicación de técnicas de caracterización molecular detecta una mayor variabilidad en ella comparada con los patógenos estrictos *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: así, además de la secuencia de ITS, también presenta diferencias en el gen *hsp65* (Turenne et al., 2006) y un mayor polimorfismo a nivel de LSPs (*Long Sequence Polymorphisms*) (Semret et al., 2006b; Semret et al., 2004). Es una bacteria saprofita, de mucha menor patogenicidad que las dos anteriores, y que se comporta como un patógeno oportunista.

A nivel veterinario esta especie presenta un interés más reducido, ya que no suele originar enfermedad clínica en los animales. Su impacto más relevante se da en la especie porcina, donde puede originar lesiones granulomatosas, fundamentalmente en los linfonodos situados en la cabeza y mesentéricos (Thorel et al., 1997; Thorel et al., 2001). A pesar de que los cerdos no muestran signos clínicos, el hallazgo de estas lesiones en el matadero puede dar lugar a un importante descenso en el valor económico del animal (Matlova et al., 2004), habiéndose descrito casos en todos los continentes (Bauer et al., 1999; Bono et al., 1995; Feizabadi et al., 1996; Johansen et al., 2007; Komijn et al., 1999; Matlova et al., 2005; Matlova et al., 2004; Mobius et al., 2006; Nel, 1981; Oliveira et al., 2003; Ritacco et al., 1998; Thegerstrom et al., 2005; Thorel et al., 2001; Tirkkonen et al., 2007). En ocasiones es difícil precisar si en los estudios publicados se describen aislamientos de *M. avium* subsp. *hominissuis* o *M. avium* subsp. *avium* debido a una incompleta caracterización de las cepas; de cualquier forma, en la mayoría de los trabajos en los que sí se

realiza una identificación completa de los aislados, la proporción de la primera subespecie suele ser mayor que la segunda, con algunas excepciones (Mobius et al., 2006; Thegerstrom et al., 2005), tal vez debido a distintos factores de exposición. La ubicación de las lesiones indica que la vía de infección es normalmente oral, aunque se han descrito lesiones circunscritas a linfonodos bronquiales (di Guardo G. et al., 1991).

También se ha aislado de muestras de vacuno (Dvorska et al., 2004), aunque al igual que sucede en porcino, en muchos estudios no se llega a diferenciar entre *M. avium* subsp. *hominissuis* o *M. avium* subsp. *avium*, y resulta difícil estimar la prevalencia real de infección. Tampoco origina cuadros clínicos, ya que el vacuno parece resistente a la infección (Weiss et al., 2002), aunque puede dar lugar a lesiones visibles en matadero que se lleguen a confundir con las producidas por *M. bovis* (Thorel et al., 1997). La importancia fundamental de *M. avium* en el vacuno radica en su capacidad para inducir falsas reacciones positivas o negativas en los tests de diagnóstico de la tuberculosis bovina, pudiendo comprometer así el éxito de los planes de erradicación (Amadori et al., 2002; Dunn et al., 2005; Hope et al., 2005; Lauzi et al., 2000; Walravens et al., 2002; Waters et al., 2004). Al ser *M. avium* subsp. *hominissuis* la subespecie más ampliamente distribuida, es probable que sea la causante de un gran porcentaje de las sensibilizaciones inespecíficas producidas en el marco de las campañas de saneamiento.

Aunque de forma poco frecuente, también se han publicado estudios de infecciones en la especie equina por *M. avium* (normalmente, sin precisar la subespecie) causando diversos cuadros, desde artritis sépticas (Hewes et al., 2005) a problemas oculares (Leifsson et al., 1997), abortos (Cline et al., 1991; Helie and Higgins, 1996), pérdida de peso e hipoproteinemia (Buergelt et al., 1988) e incluso infecciones generalizadas (Gunnes et al., 1995).

De forma más o menos esporádica también se ha aislado *M. avium* de animales de compañía (Horn et al., 2000; Naughton et al., 2005; O'Toole et al., 2005) y fauna salvaje (Cho et al., 2006), pero normalmente en casos aislados.

De mucha mayor relevancia es el papel del complejo *avium* en general y de *M. avium* subsp. *hominissuis* en particular como patógenos oportunistas en Salud Pública. Desde el primer caso de infección en humanos por un miembro de MAC publicado en 1943 (Feldman et al., 1943) hasta la aparición del virus del SIDA, se describían fundamentalmente dos presentaciones (Ashford et al., 2001b; Falkinham, III, 1996; Inderlied et al., 1993; Wayne and Sramek, 1992):

- una forma pulmonar, normalmente en individuos inmunocompetentes

pero con otras enfermedades respiratorias predisponentes como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis, tuberculosis previas, enfisema o fibrosis quística. La sintomatología de este cuadro es altamente inespecífica, con fiebre, fatiga, sudores, tos no productiva y hemoptisis.

- causando linfadenopatías, fundamentalmente en niños, y afectando a linfonodos cervicales, submaxilares, preauriculares o submandibulares.

La importancia de esta bacteria en Salud Pública ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a la combinación de una serie de factores: por una parte, la aparición del VIH, el progresivo envejecimiento de la población en los países desarrollados y el incremento en el uso de terapias inmunosupresoras, han aumentado la población inmunodeprimida y por tanto susceptible a MAC (Falkinham, III, 2003b); por otra, la creciente implantación a nivel mundial de tratamientos potabilizadores del agua puede producir una selección positiva de bacterias resistentes a la cloración, como los miembros de MAC (Falkinham, III, 2003a; Primm et al., 2004).

Por todo ello, la epidemiología de MAC ha ido evolucionando hacia la aparición de nuevas formas: en individuos inmunosuprimidos puede provocar infecciones generalizadas, siendo la infección por VIH el factor de riesgo más importante asociado con la enfermedad por *M. avium* (Inderlied et al., 1993). Desde la primera noticia de infección diseminada por MAC en pacientes con SIDA en 1982 (Zakowski et al., 1982) se han publicado numerosos trabajos en relación a estas dos enfermedades, describiendo frecuencias de infección por MAC del 10-20% hasta el 50% en pacientes con SIDA en países desarrollados (Ashford et al., 2001b; Horsburgh, Jr., 1991; Nightingale et al., 1992), aunque con la instauración de las terapias anti-retrovirales y tratamientos antibióticos combinados frente a MAC esos números han disminuido considerablemente con posterioridad (Horsburgh, Jr. et al., 2001; Karakousis et al., 2004b). Cabe destacar que la cepa de *M. avium* subsp. *hominissuis* cuyo genoma ha sido secuenciado, *M. avium* 104, fue aislada de un paciente con VIH en California a mediados de los 80.

Además MAC también puede producir patologías pulmonares en pacientes inmunocompetentes sin otras enfermedades respiratorias predisponentes: este cuadro, que en ocasiones recibe el nombre de “síndrome de Lady Windermere”, afecta preferentemente a mujeres no fumadoras de edad madura, y su incidencia ha aumentado en los últimos años (Falkinham, III, 2003b; Field et al., 2004; Martins et al., 2005; Tutor-Ureta et al., 2006)

Por último, *M. avium* puede ser aislado de muestras procedentes de pacientes sin patologías aparentes, indicando una posible contaminación de la mues-

tra o una colonización transitoria del hospedador (Aronson et al., 1999). Esto último dificulta en gran medida la interpretación de cultivos positivos de *M. avium* a partir de muestras no estériles, por lo que la *American Thoracic Society* (ATS) estableció unos requisitos para identificar aquellos pacientes que deben ser considerados como enfermos de MAC (van Soolingen et al., 1997b).

A pesar de ser una enfermedad de gran relevancia la epidemiología de la misma no está clara: al estar causada por una micobacteria ubicua, la fuente de infección en pacientes humanos no siempre llega a ser identificada. Aunque *M. avium* puede infectar muchos animales salvajes y domésticos, éstos no suelen considerarse una fuente de infección importante para el hombre, y la transmisión entre personas no ha sido documentada. En la actualidad el agua contaminada con *M. avium* se considera el mayor factor de riesgo en la adquisición de la enfermedad (Falkinham, III, 1996; Inderlied et al., 1993), especialmente teniendo en cuenta que se ha comprobado que los miembros de MAC pueden colonizar de forma persistente los sistemas de canalización de agua en edificios públicos y hospitales y por tanto ser una fuente de infección para poblaciones susceptibles (Aronson et al., 1999; Primm et al., 2004; Vaerewijck et al., 2005; Von Reyn et al., 1994). En ocasiones, sin embargo, el agua puede contaminar muestras clínicas, complicando la interpretación de los resultados (Aronson et al., 1999).

El tratamiento de las infecciones por MAC depende del cuadro de presentación de la enfermedad, habiéndose ensayado con múltiples combinaciones de antibióticos (Falkinham, III, 1996). En la actualidad la mayoría de los tratamientos consisten en el uso de claritromicina o azitromicina combinados con etambutol, rifampicina o rifabutinina (Horsburgh, Jr. et al., 2001; Inderlied et al., 1993; van Soolingen et al., 1997b). En el caso de pacientes con VIH es conveniente administrar quimioprofilaxis con estos mismos antibióticos si el recuento de CD4 es menor de 50-100 células/mL (Horsburgh, Jr. et al., 2001). En el caso de linfadenitis causadas por *M. avium*, el tratamiento recomendado es la cirugía, que presenta una tasa de éxito del 95% (Schaad et al., 1979; van Soolingen et al., 1997b).

Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum

También llamada la “micobacteria de la paloma torcaz” (*wood pigeon mycobacteria*) debido a que fue aislada en primer lugar de esta especie animal (Christiansen et al., 1946), sus características diferenciales con otros miembros de MAC (particularmente con *M. avium* subsp. *avium*) siguen siendo un moti-

vo de debate. Estudios basados en la comparación de ADN determinaron una relación muy estrecha con *M. avium* y *Map* (Saxegaard and Baess, 1988), y recibió su nombre actual en 1990 basándose la diferenciación de las otras subespecies en sus características fenotípicas (Thorel et al., 1990). Algunos de sus principales rasgos distintivos son su dependencia de micobactina en aislamiento primario, aunque no en posteriores subcultivos (Matthews et al., 1978; Thorel, 1984), y su incapacidad para crecer en medios que incorporen huevo en su composición (Thorel et al., 1990). Además de aves, esta bacteria también puede infectar rumiantes salvajes y domésticos, provocando lesiones similares a las de tuberculosis (Collins et al., 1985; Jorgensen and Clausen, 1976). Su cepa tipo es la ATCC 48898 (*strain 6409*), aislada de una paloma torcaz.

La polémica sobre la diferenciación real entre *M. avium* subsp. *silvaticum* y el resto de MAC deriva del hecho de que, a pesar de los grandes avances en el estudio molecular logrados en el campo de la microbiología en los últimos 20 años, no se han llegado a caracterizar grandes polimorfismos a nivel genético característicos de esta subespecie. Un estudio realizado mediante el empleo de electroforesis en campo pulsado describió una uniformidad en los perfiles obtenidos a partir de *M. avium* subsp. *silvaticum* respecto a los de otros miembros de MAC (Levy-Frebault et al., 1989), pero este método no es adecuado para delimitar especies bacterianas (Turenne et al., 2007). La secuencia de inserción IS902 fue descrita en un principio como un elemento específico de *M. a. silvaticum* (Moss et al., 1992), pero la comparación con IS901 revela una homología mayor del 99%, poniendo en duda la diferencia real entre las dos (Turenne et al., 2007). Otra secuencia descrita inicialmente en esta subespecie y en *Map*, el elemento GS (Tizard et al., 1998), también ha sido encontrado en aislados de *M. avium* subsp. *avium* (Bull et al., 2000). Tampoco la secuenciación del gen *hsp65* (Turenne et al., 2006) o el estudio de LSPs (Semret et al., 2006b) revelan diferencias entre *M. avium* subsp. *avium* y *silvaticum*, a pesar de que sí se detectan polimorfismos respecto a las otras subespecies. Por todo ello, y a la espera de nuevas evidencias que diferencien estas dos subespecies, resulta lógico especular con la posibilidad de que *M. avium* subsp. *silvaticum* represente un subtipo de *M. avium* subsp. *avium* adaptado a un hospedador específico (la paloma torcaz) (Turenne et al., 2007).

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*)**

Es la bacteria más importante del complejo *avium* desde el punto de vista veterinario, ya que es el agente causal de una enfermedad de gran relevancia en rumiantes domésticos: la paratuberculosis o enfermedad de Johne.

Esta bacteria, descrita por primera vez en 1895 (Johne and Frothingham, 1895), recibió el nombre de *Mycobacterium paratuberculosis* en 1923 (Bergey et al., 1923), y fue considerada una micobacteria distinta de la aviar con base en sus diferencias fenotípicas. Sin embargo, con la llegada de las técnicas de estudio genético, se comprobó la elevada homología existente entre *Map* y *Mycobacterium avium* (Saxegaard and Baess, 1988; Saxegaard et al., 1988). Por ello, en 1990 se agruparon estas dos especies, junto con la micobacteria de la paloma torcaz, quedando todas ellas agrupadas como subespecies de *M. avium* (Thorel et al., 1990).

Map es un patógeno intracelular obligado cuyas características fenotípicas diferenciales más sobresalientes son fundamentalmente su dependencia del aporte exógeno de micobactina para su cultivo *in-vitro* y la extremada lentitud de su crecimiento. La micobactina es un agente quelante del hierro, necesario para el transporte de este metal al interior de la célula. Para el cultivo inicial de *Map* se utilizó la micobactina P, obtenida a partir de cultivos de *Mycobacterium phlei* (Francis et al., 1953). En la actualidad está extendido el uso de la micobactina J, obtenida a partir de cepas de *Map* modificadas tras múltiples pases en medios de cultivo en el laboratorio (Merkal and McCullogh, 1882). Sin embargo, la capacidad de ciertas cepas de *Map* para crecer en ausencia de micobactina (Aduriz et al., 1995) o gracias al aporte de otras sustancias que aporten el hierro necesario para el metabolismo bacteriano (Merkal and Curran, 1974), así como la facultad para sintetizar micobactina por parte de ciertas cepas (Barclay et al., 1985; Merkal and McCullogh, 1882) ponen en cuestión la especificidad de la necesidad del aporte de micobactina en *Map*, al menos para algunas cepas. Del mismo modo, si bien el tiempo necesario para su crecimiento *in vitro* de *Map* no suele ser menor de 4 meses, se han descrito importantes diferencias entre distintas cepas, remarcando la existencia de al menos dos fenotipos dentro de esta subespecie.

Desde el punto de vista genético, *Map* es una de las dos bacterias del complejo *avium* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo, el de la cepa k10 (Li et al., 2005), constando de 4.829.781 pares de bases que forman un único cromosoma circular y codifican 4350 ORFs, 45 ARNt y un operón ARNr. Mediante técnicas de análisis *in silico* se han identificado más de 3000 genes homólogos a otros descritos en *M. tuberculosis*, así como 161 regiones genómicas únicas que codifican 39 genes de *Map* que no habían sido descritos antes. Antes de la finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *Map* ya habían sido descritas varias secuencias y elementos específicos en su ADN: el primero y más utilizado de todos ha sido sin duda el IS900, si bien puede plantear problemas de especificidad (ver IS900, pág 70). Para solucio-

nar ese problema, el uso de otras secuencias alternativas ha sido contemplado en distintos estudios.

Al aplicar distintas técnicas de caracterización molecular en el complejo *avium*, los aislados de *Map* siempre ofrecieron una mayor homogeneidad que los de *M. avium* subsp. *hominissuis* o *M. intracellulare*. Sin embargo, desde que comenzaron a aplicarse las primeras técnicas de caracterización molecular basadas en el estudio de todo el cromosoma bacteriano se describieron dos grupos bien diferenciados de perfiles: en diversos estudios independientes, el RFLP-IS900 separó las cepas aisladas de muestras de ovino y de caprino (y que presentaban una velocidad de crecimiento extremadamente lenta) de las cepas procedentes de vacuno y de otras especies, incluyendo algunas de pequeños rumiantes (ver RFLP, pág. 66). Al estandarizar el protocolo se definieron tres grupos, Bovino (*Cattle*), Ovino (*Sheep*) e Intermedio (*Intermediate*) (Pavlik et al., 1999). Aplicando una técnica distinta, y dirigida a otras dianas en el cromosoma bacteriano, los mismos resultados se obtuvieron mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) dividiéndose los aislados analizados en tres grandes grupos, que se llamaron I, II y III (ver PFGE, pág. 73). El inconveniente fundamental de estas técnicas es la necesidad de utilizar una gran cantidad de ADN bacteriano, lo que, en ocasiones, no es fácil cuando se trabaja con micobacterias de cultivo tan lento y difícil como *Map*.

Al ir aplicando técnicas moleculares sobre nuevas dianas genéticas, la diferencia existente entre estos grupos ha seguido poniéndose de manifiesto, si bien en algunos casos solo se pueden diferenciar los tipos I y II, quedando los aislados de tipo III integrados junto a los I: es el caso del SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, o mutación puntual) descrito en la secuencia de inserción IS1311 (pág. 69), la secuenciación del gen *hsp65* (Turenne et al., 2006) o la PCR diseñada por Collins y colaboradores dirigida a la región adyacente a la secuencia de inserción de IS900 (Collins et al., 2002). En un estudio realizado sobre 25 genes en aislados de *Map* de tipo I y II, Marsh y colaboradores detectaron 11 SNPs pertenecientes a 8 genes (*hsp65*, *sodA*, *dnaA*, *dnaN*, *recF*, *gyrB*, *inhA* y *pks8*) que podían diferenciarlos, aunque por desgracia no se incluyó una cepa de tipo III en la comparación (Marsh and Whittington, 2007). Del mismo modo, la secuenciación del IS900 en un pequeño panel de cepas de *Map* reveló que, mientras que las cepas de tipo II mostraban una secuencia idéntica con la descrita en *Map* k10, todas las cepas de tipo I mostraban indeterminaciones en dos *loci* en concreto (Semret et al., 2006a). Por último, al realizar análisis mediante RDA (*Representational Difference Analysis*) se detectaron otros tres *loci* específicos de las cepas de

tipo I ausentes en las de tipo II (y curiosamente presentes en *M. avium*) (Dohmann et al., 2003). En el único análisis basado en PCR capaz de distinguir los tres tipos de cepas de *Map* realizado hasta la fecha, Castellanos y colaboradores encontraron varios SNPs en los genes *gyrA* y *gyrB* que podían ser puestos de manifiesto mediante PCR-REA (*Restriction Endonuclease Analysis*), dando distintos patrones de bandas para cada uno de los tipos de aislado (Castellanos et al., 2007).

Estas diferencias, presentes en forma de SNPs o pequeños fragmentos de ADN, se ven confirmadas por los LSPs detectados al realizar *microarrays* con cepas de tipo I en comparación con el genoma secuenciado de la cepa k10: tres grandes fragmentos de ADN, presentes en *Map* k10, no fueron detectados en cepas de tipo I (Marsh et al., 2006; Marsh and Whittington, 2005; Semret et al., 2006b).

Estos distintos grupos no están distribuidos geográficamente de forma uniforme. Así, mientras que el tipo II es el más ampliamente extendido (es el más frecuente en Europa) y ha sido aislado a partir de un amplio rango de hospedadores (Collins et al., 1990; Greig et al., 1999; Pavlik et al., 1995; Pavlik et al., 1999), los tipos I y III han sido cultivados con mucha menor frecuencia, y normalmente se aíslan de especies rumiantes domésticas (Collins et al., 1990; Cousins et al., 2000; de Juan et al., 2006; de Juan et al., 2005; Sevilla et al., 2007; Stevenson et al., 2002; Whittington et al., 2000; Whittington et al., 2001).

Combinando los distintos hallazgos obtenidos a través de dos aproximaciones moleculares opuestas (SNPs frente a LSPs) se ha especulado sobre la posible filogenia de las especies de *M. avium* y, en particular, sobre la evolución de los tipos de *Map* a partir de *M. avium*: partiendo de la base de que todas las subespecies de *M. avium* han evolucionado a partir de un ancestro común, los hallazgos iniciales de características comunes entre *M. avium* y aislados de tipo I, pero distintos en los de tipo II [como el SNP en IS1311 (Whittington et al., 1998) o los fragmentos pig-RDA10, pig-RDA20 y pig-RDA30 (Dohmann et al., 2003)] plantearon la posibilidad de que el tipo I fuera un estado evolutivo intermedio entre el ancestro común y el tipo II, que experimentó más alteraciones en su genoma. Sin embargo, la reciente descripción de tres grandes deleciones en el tipo I respecto al tipo II cuya secuencia está conservada en *M. avium* 104 en su mayor parte (aunque invertida en algunas partes) (Marsh et al., 2006), y el hecho de que los 11 SNPs diferenciadores de los tipos I y II descritos por Marsh y colaboradores estuvieran repartidos casi por igual en el genoma de *M. avium* 104, (6 SNPs propios de

tipo I y 5 del tipo II) (Marsh and Whittington, 2007) cuestiona esa mayor proximidad propuesta entre *M. avium* y *Map* tipo I. En la actualidad se están realizando también *microarrays* comparando los genomas de *M. avium* 104 y *Map* k10 con cepas de tipo III en un intento de esclarecer las características diferenciales de ese subgrupo (Castellanos *et al.*, manuscrito en preparación). Sin duda la próxima publicación del genoma de la cepa S (tipo I) (Paustian *et al.*, 2007) ofrecerá nuevas respuestas a la relación filogenética entre los distintos grupos de aislados de *Map*.

La importancia de *Map* en salud pública deriva fundamentalmente de la controversia acerca de su posible papel en el desencadenamiento, establecimiento o persistencia de la enfermedad de Crohn. Ésta es una enfermedad crónica inflamatoria del intestino en el hombre, caracterizada por malestar general, pérdida crónica de peso, dolor abdominal y diarreas, acompañado en ocasiones por fiebre (Chiodini, 1989; Stange *et al.*, 2006). Fue descrita por primera vez en 1913 por Dalziel (Dalziel, 1913), aunque recibió su nombre del autor de otra descripción posterior de la enfermedad como una patología que afectaba al intestino delgado (Crohn *et al.*, 1932). Posteriormente se ha reconocido que, si bien las lesiones se localizan fundamentalmente en el íleon distal, cualquier parte del tracto gastrointestinal puede estar afectada (Grant, 2005). Forma parte de las llamadas Enfermedades inflamatorias del intestino (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) junto con la colitis ulcerosa; estas enfermedades resultan difíciles de definir, puesto que son más bien síndromes caracterizados por un fenotipo clinicopatológico similar pero con varias causas (Shanahan, 2002). Por ello, los enfermos de Crohn forman un grupo muy heterogéneo, que puede dividirse en 24 subgrupos atendiendo a tres parámetros: edad en el primer diagnóstico, localización de la enfermedad en el tracto gastrointestinal y comportamiento de la enfermedad (más o menos invasiva, o constrictiva) (Gasche *et al.*, 2000). Dada la gran variedad existente entre distintos casos de la enfermedad se especula con que no todos tengan una misma etiología (Grant, 2005).

Las posibles causas de la enfermedad que se han ido investigando a lo largo de los años incluyen (Grant, 2005):

- Un origen infeccioso, debido a micobacterias (*Map*), *E. coli*, *Listeria*, o virus.
- defectos en la mucosa intestinal que dan lugar a desequilibrios en la absorción de bacterias y alimentos.
- alteraciones de la respuesta inmune (problemas de autoinmunidad, lo que se traduce en una respuesta inadecuada del sistema inmune de la

mucosa intestinal a la flora bacteriana normal produciendo alteraciones; o problemas de inmunodeficiencia, lo que implica que no se eliminan de forma normal los microorganismos, y por ello se provoca una respuesta inmune celular compensatoria que da lugar a los trastornos).

- susceptibilidad genética.

En la actualidad hay un consenso en la comunidad científica acerca del origen multifactorial de la enfermedad de Crohn, que implicaría una interacción entre ciertos factores de susceptibilidad genética, uno o varios microorganismos y la respuesta inmune del hospedador desencadenada por una lesión en el tejido (Shanahan, 2002).

La enfermedad de Crohn es una patología propia de países desarrollados, y su incidencia, al igual que la del resto de enfermedades inflamatorias del intestino, está experimentando un crecimiento en los últimos años (Loftus, Jr. and Sandborn, 2002). La edad de presentación más habitual es de los 16 a los 25 años, aunque puede aparecer antes o en edad adulta, y afecta por igual a ambos sexos (Grant, 2005; Loftus, Jr. and Sandborn, 2002; Stange et al., 2006). Aún no se ha descubierto una cura, por lo que los únicos tratamientos descritos son paliativos, requiriendo en un amplio porcentaje de los casos (70-80%) cirugías para eliminar el intestino afectado, que posteriormente suelen recaer (Chiodini, 1989); el abanico terapéutico disponible para controlar los síntomas es muy amplio, dependiendo el tratamiento del grado de enfermedad, localización de la misma, presencia de otras manifestaciones clínicas, posibles efectos adversos de los medicamentos, etc, por lo que debe valorarse individualmente (Travis et al., 2006). Normalmente se dirige a aliviar los síntomas, basándose en antidiarreicos, antiinflamatorios e inmunosupresores. El desconocimiento de la causa de la enfermedad impide el diseño de tratamientos etiológicos.

En lo referente a la posible relación entre *Map* y esta patología cabe destacar que la primera asociación entre paratuberculosis y enfermedad de Crohn data de 1913, pues ya Dalziel comparaba ambas enfermedades basándose en las similitudes en el cuadro clínico y las lesiones (Dalziel, 1913). Desde entonces se ha especulado mucho sobre el posible origen infeccioso de la enfermedad de Crohn. En un intento de responder a esta incógnita, se han realizado numerosos estudios en pacientes de Crohn y de otras IBDs (fundamentalmente de colitis ulcerativa) en busca de evidencias de un contacto con *Map*.

El cultivo bacteriológico de la bacteria en muestras de pacientes enfermos de Crohn es sin duda la demostración irrefutable de su presencia en un estado

viable, pero en ocasiones es muy difícil de lograr. El primer aislamiento de una micobacteria fue obtenido por Chiodini y colaboradores (Chiodini et al., 1984). En un principio no pudieron identificarla, ya que estaba en lo que luego se definió como esferoplasto o forma con pared celular deficiente (CWD, *Cell Wall Deficient*) (Chiodini et al., 1986), pero observaron algunas características, como el extremadamente largo periodo de incubación (18 meses) y su dependencia de micobactina para el crecimiento *in vitro*. Posteriormente se demostró que ese esferoplasto podía adoptar con el tiempo una forma bacilar, siendo su forma primaria la probable causa del prolongado tiempo necesario para su primoaislamiento y de su incapacidad para teñirse con las técnicas convencionales (Chiodini et al., 1986). Finalmente se identificaron esos esferoplastos como *Map* gracias a análisis de ADN (McFadden et al., 1987). Desde entonces se ha intentado aislar *Map* a partir de biopsias de pacientes de Crohn y controles con resultados irregulares: en un estudio realizado en 439 casos de enfermos de IBD y 324 controles no se consiguió aislar *Map* en ningún caso (aunque sí detectar su ADN) (Collins et al., 2000), mientras Schwartz y colaboradores (Schwartz et al., 2000), Bull y colaboradores (Bull et al., 2003), y Sechi y colaboradores (Sechi et al., 2005) sí cultivaron la bacteria empleando muestras de mucosa intestinal de un porcentaje mayor de casos enfermos que de controles sanos; también se pudo cultivar a partir de un paciente de VIH a partir de muestras de sangre, heces y de una biopsia (Niemann et al., 2002b). Naser y colaboradores dieron un paso más al demostrar la distribución sistémica de *Map* mediante cultivo en leche materna de pacientes de Crohn y en sangre de pacientes de Crohn y enfermos de colitis ulcerativa, pero no de los controles (Naser et al., 2004; Naser et al., 2000b).

Dada la dificultad que entraña el cultivo bacteriológico se han adoptado otras dos estrategias para demostrar la implicación de *Map* en la enfermedad de Crohn: la detección de secuencias específicas de su ADN en muestras clínicas (fundamentalmente IS900, aunque esto puede plantear problemas de especificidad; pág. 70) y el análisis serológico en busca de anticuerpos frente a la bacteria. Las técnicas de detección de ADN pueden a su vez subdividirse en las basadas en la extracción del ADN bacteriano y la realización de PCRs o bien las que emplean una sonda específica para realizar una hibridación *in situ*. Desde la primera detección de IS900 de muestras de pacientes de Crohn (Sanderson et al., 1992) se han realizado numerosos estudios, ofreciendo en muchas ocasiones resultados contradictorios. Los diferentes protocolos aplicados, especialmente a la hora de extraer el ADN, podrían explicar esta heterogeneidad; concretamente el no aplicar un protocolo suficientemente agresivo, incorporando una fase de ruptura mecánica de las células, ha sido esgrimido como causa de falsos negativos (Bull et al., 2003; Hermon-Taylor

et al., 2000). De cualquier forma, tomando como referencia los trabajos publicados a partir del 2000, se pueden encontrar estudios que describen un porcentaje mayor de muestras positivas procedentes de Crohn respecto a controles sanos o con otras enfermedades (Autschbach et al., 2005; Bull et al., 2003; Collins et al., 2000; Hulten et al., 2001; Naser et al., 2004; Romero et al., 2005; Ryan et al., 2002; Sechi et al., 2001; Sechi et al., 2005), mientras que otros reflejan resultados discordantes (Baksh et al., 2004; Bernstein et al., 2003; Ellingson et al., 2003; Fujita et al., 2002; Tzen et al., 2006). En una aproximación ligeramente diferente, Ryan y colaboradores describieron la mayor tasa de detección de ADN de *E.coli* en granulomas de enfermos de Crohn respecto a los controles, reflejando así la posibilidad de que en estos pacientes haya un incremento no específico de la carga bacteriana (Ryan et al., 2004). Sin embargo Clancy y colaboradores detectaron un incremento en los niveles de TNF- α de las muestras de pacientes de Crohn asociado a la presencia de ADN de *Map* (Clancy et al., 2007).

En cuanto a las evidencias aportadas por las pruebas serológicas, el antígeno empleado para detectar los anticuerpos parece tener una gran influencia en los resultados (Grant, 2005). De cualquier forma, una vez más no hay unanimidad en los resultados obtenidos, pues mientras hay autores que detectan un mayor título de anticuerpos frente a elementos de *Map* en pacientes de Crohn (Barta et al., 2004; Collins et al., 2000; Nakase et al., 2006; Naser et al., 1999; Naser et al., 2000a; Olsen et al., 2001; Olsen et al., 2003; Shafran et al., 2002b) otros estudios no encuentran asociación entre ambos hechos, o en relación a un genotipo susceptible (ver más adelante) (Bernstein et al., 2004; Bernstein et al., 2007). Una posible explicación a la discordancia entre los resultados reseñados reside en la posibilidad de reacciones cruzadas en el ELISA que den lugar a falsos positivos (Polymers et al., 2006).

Recientemente se realizó una revisión y meta-análisis de los trabajos publicados relativos al aislamiento de ADN de *Map* y a la detección de anticuerpos en pacientes de Crohn (Feller et al., 2007). La primera conclusión de dicho trabajo fue que muchos trabajos adolecían de defectos de forma, especialmente en el tamaño de los grupos (casos/controles) y en la selección del grupo de individuos control. A pesar de ello se concluyó que en ambos casos (detección de ADN y serología) se observaba una asociación estadísticamente significativa entre un resultado positivo y ser paciente de Crohn. Sin embargo esta asociación no puede confirmar por sí misma el papel de *Map* como inductor de la enfermedad (Feller et al., 2007).

Una última aproximación al problema consiste en la valoración de los resul-

tados de los tratamientos de pacientes de Crohn basados en antibióticos a los que *Map* es sensible. Básicamente, el tratamiento frente a la enfermedad de Crohn se basa en la supresión de la respuesta inmune del hospedador (mediante corticoesteroides), antiinflamatorios, cirugía, suplementos nutricionales y antibióticos (Grant, 2005). Según algunos investigadores, la remisión del cuadro clínico de algunos casos gracias a tratamientos antibióticos (normalmente una combinación de claritromicina, rifabutina y/o clofazimina) vendría dado por su efecto sobre *Map* (Hermon-Taylor, 2002). Una vez más, también en este apartado se han publicado resultados contradictorios, que van desde la remisión del cuadro clínico en ciertos pacientes de Crohn (Borody et al., 2007; Borody et al., 2002; Shafran et al., 2002a) hasta la producción de una mejora momentánea (atribuida a un efecto antibacteriano inespecífico) seguida de un mantenimiento de los síntomas sin beneficio observable (Selby et al., 2007). Resulta difícil valorar el posible efecto de estos antibióticos frente a *Map* dada su condición de patógeno intracelular y su metabolismo extremadamente lento. Recientemente se ha descrito un posible efecto bacteriostático y bactericida *in vitro* de algunos medicamentos aplicados en el tratamiento de Crohn como inmunosupresores (Tiopurinas como la 6-mercaptopurina y la azatioprina) (Collins and Shin, 2007; Greenstein et al., 2007) lo que haría necesario valorar de nuevo los estudios publicados hasta la fecha, pues en muchos de ellos se administraban estos inmunosupresores junto con los antibióticos; de igual forma da una explicación a la mejora experimentada por pacientes tratados solo con inmunomoduladores, incompatible con una enfermedad de etiología bacteriana, lo que constituía un argumento para los detractores de la teoría de *Map* como agente causal de la enfermedad de Crohn.

Desde una óptica diferente, se han identificado varios genes asociados con la presencia de esta enfermedad, entre ellos el gen NOD2/CARD15, implicado en la destrucción bacteriana en las células del epitelio intestinal, lo que constituye un indicio de una posible etiología bacteriana asociada (Girardin et al., 2003; Hugot et al., 2001; Rioux et al., 2007). De hecho se ha descrito el caso clínico de un paciente de Crohn en posesión de los alelos de susceptibilidad de NOD2/CARD15 que sufría una infección por *Map* (Behr et al., 2004). La proporción de casos de Crohn atribuibles a mutaciones en el gen NOD2/CARD15 no rebasa el 15-30%; esto podría resaltar la importancia de otros factores genéticos y ambientales responsables de otros casos. Por otra parte, una proporción muy elevada de personas con los alelos de riesgo no desarrollan la enfermedad. Esto último puede explicarse porque haya otras rutas compensatorias del déficit protector que origina esa mutación, o bien porque la mutación solo sea un factor de riesgo en presencia de algún otro elemento, como podría ser la acción de un microorganismo (Behr and Schurr, 2006).

A pesar de los muchos estudios realizados en distintos campos, la relación entre *Map* y la enfermedad de Crohn sigue siendo objeto de controversia (Cirone et al., 2007; Grant, 2005; Greenstein, 2003; Hermon-Taylor, 2001; Hermon-Taylor and Bull, 2002; Quirke, 2001; Raizman, 2007; Sartor, 2005; Selby, 2003; Shanahan, 2002; Shanahan and O'Mahony, 2005). A la luz de los últimos estudios revisados anteriormente parece existir un grado de asociación entre la presencia de la bacteria y al menos una proporción relevante de los casos de pacientes de Crohn (Abubakar et al., 2007a; Uzoigwe et al., 2007). Sin embargo a día de hoy la naturaleza de esa asociación sigue sin ser determinada, por lo que no se puede asumir un papel causal de *Map* en el desencadenamiento de la enfermedad, tal y como fue concluido por el panel de expertos de la Comisión Europea en el informe emitido en el año 2000 (http://www.ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out38_en.pdf).

También se ha asociado *Map* a la etiología de otras enfermedades como la sarcoidosis (el Zaatari et al., 1996) y a la diabetes mellitus tipo 1 (Dow, 2006; Sechi et al., 2008; Sechi et al., 2007a; Sechi et al., 2007b).

El potencial riesgo que podría implicar la exposición a *Map* en relación a estas enfermedades ha hecho que se haya puesto el foco en las posibles vías de transmisión al ser humano (Collins, 1997). En este sentido, es conocida la capacidad de los animales infectados de paratuberculosis de excretar el microorganismo en la leche (ver patogenia, pág. 26). Por ello el consumo de leche de animales infectados podría ser un factor de riesgo en el caso de que contuviera cantidades suficientes de bacterias viables. Numerosos trabajos han detectado la presencia de *Map* mediante PCR o cultivo en muestras de leche individuales o de tanques procedentes de ovino, caprino y bovino (Arrigoni et al., 2007; Bosshard et al., 2006; Giese and Ahrens, 2000; Grant et al., 2002a; Grant et al., 2001; Paolicchii et al., 2003; Pillai and Jayarao, 2002; Shankar et al., 2007). Teniendo en cuenta que la mayor parte de la leche dedicada al consumo humano se somete previamente a tratamientos térmicos, se han realizado numerosos estudios para determinar la capacidad de *Map* para sobrevivir a dichos tratamientos (a los que habitualmente se somete la leche), diseñados para la inactivación de *M. bovis*. Todos los estudios destacan la mayor capacidad de *Map* para resistir el calor, aunque sus resultados sobre su capacidad para permanecer viable en concentraciones detectables difieren. Tomando como referencia los trabajos publicados en los últimos siete años, mientras algunos concluyen que las actuales condiciones de pasteurización deberían eliminar las cantidades esperables de bacterias (Cerf et al., 2007; Pearce et al., 2001; Rademaker et al., 2007; Stabel, 2001), otros estudios concluyen que parte las micobacterias pueden subsistir en leche naturalmente (Grant et al.,

2002b) o artificialmente infectada (Gao et al., 2002; Grant et al., 2005; McDonald et al., 2005; Stabel and Lambertz, 2004). Además de la temperatura, otros factores como la presión (Donaghy et al., 2007) o la homogeneización durante el tratamiento (Grant et al., 2005) pueden afectar a las tasas de supervivencia de *Map* [si bien no en todos los casos (Rademaker et al., 2007)]. Resulta difícil comparar los resultados de los distintos estudios debido a la existencia de distintas condiciones de laboratorio, lo que hace necesaria la unificación de la metodología para poder concluir mediante experiencias de laboratorio si la leche, sometida a los tratamientos térmicos actuales, supone un riesgo potencial o no para el público (Lund et al., 2002; Stabel, 2000). De cualquier forma, la probabilidad de encontrar *Map* en leche pasteurizada será tanto mayor como sea su concentración en la leche previa al tratamiento, viéndose favorecida su supervivencia por su capacidad de formar agregados (Grant, 2005).

Siguiendo un enfoque distinto de las anteriores investigaciones de laboratorio, algunos grupos han podido evidenciar la presencia de *Map* en leche pasteurizada lista para su comercialización. En este caso es muy importante la diferenciación entre la detección de ADN (Lillini et al., 2008; O'Reilly et al., 2004) y la de bacterias (Ayele et al., 2005; Ellingson et al., 2005; Grant et al., 2002a; Millar et al., 1996; Paolicchii et al., 2006; Shankar et al., 2007), ya que mientras que la primera puede suponer que la pasteurización ha inactivado los bacilos presentes, la detección de *Map* por cultivo implica un potencial riesgo de infección. No obstante algunos autores atribuyen estos aislamientos a fallos en los procesos de pasteurización o posibles contaminaciones cruzadas en el laboratorio (Cerf et al., 2007; Mendez et al., 2006).

Además de la leche, se ha apuntado a los derivados lácteos como posibles fuentes de *Map*: el alimento más estudiado ha sido el queso. Dos trabajos valoraron la tasa de supervivencia de *Map* en el madurado de quesos preparados con leche contaminada artificialmente con bacterias: Sung y colaboradores determinaron que en la acidificación producida durante el proceso de maduración del queso fresco disminuía sensiblemente su viabilidad, mientras que el incremento en la concentración de sal no tenía efecto (Sung and Collins, 2000); Spahr y colaboradores obtuvieron resultados similares en un estudio realizado en quesos suizos curados y semicurados (Spahr and Schafroth, 2001). En ambos casos se resaltó la importancia del calentamiento previo de la leche antes del procesamiento del queso. Estudios similares realizados en queso Cheddar elaborado con leche contaminada con *Map* revelaron el riesgo de que parte de los bacilos sobrevivieran el proceso de maduración (Donaghy et al., 2003; Donaghy et al., 2004). El análisis de que-

Los procedimientos de supermercados y tiendas en distintos países revelaron la presencia de *Map* mediante detección de ADN (Clark, Jr. et al., 2006; Stephan et al., 2007) y cultivo (Ikonomopoulos et al., 2005) en un pequeño porcentaje de las muestras, revelando otra potencial vía de exposición para el consumidor.

Otros posibles vehículos de *Map* que han sido investigados son el agua y la carne. Whan y colaboradores demostraron la capacidad del microorganismo de sobrevivir a ciertos tratamientos de cloración (Whan et al., 2001), y en estudios independientes fue detectado en muestras de ríos cuya agua se destinaba después de tratamientos potabilizadores al consumo humano (Pickup et al., 2005; Pickup et al., 2006; Whan et al., 2005). La posible interacción de *Map* con protozoos presentes en el agua, demostrada experimentalmente (Mura et al., 2006; Whan et al., 2006), podría aumentar su resistencia a estos tratamientos, lo que unido a su capacidad para sobrevivir en ella durante largos periodos de tiempo (pág. 39) indica que el agua puede ser otra potencial fuente de exposición.

Por último, se ha especulado con la posibilidad de que la carne también pudiera transportar *Map*, especialmente en el caso de carne picada, elaborada con animales viejos, debido a la diseminación del microorganismo en un lote de producto si se incluyen tejidos (linfonodos) infectados (Grant, 2005). Aunque esta hipótesis es posible no ha podido ser demostrada de forma empírica hasta la fecha, ya que los estudios realizados en este sentido no han detectado la presencia de *Map* (Jaravata et al., 2007).

A pesar de todas estas evidencias, hasta la fecha no se ha podido asociar de forma inequívoca una mayor tasa de exposición a estas posibles fuentes de *Map* y una mayor incidencia de enfermedad de Crohn. Así, mientras Scanu y colaboradores sí observaron una asociación entre la infección por *Map* en pacientes de Crohn en Cerdeña y el consumo de quesos artesanales (Scanu et al., 2007), Abubakar y colaboradores no encontraron esa relación entre el establecimiento de la enfermedad y el mayor contacto con los alimentos potencialmente contaminados (agua y leche) en 218 casos y 812 controles (Abubakar et al., 2007b). Por lo tanto, siguen siendo necesarios nuevos estudios agrupando todas las facetas de la enfermedad (factores genéticos, posibles factores de riesgo tales como exposición a fuentes de *Map*, presencia de *Map* u otros agentes en pacientes y ausencia en enfermos...) para poder determinar el papel patógeno de este microorganismo en la etiología de la enfermedad de Crohn.

Vacunación frente a la paratuberculosis

En el caso de la paratuberculosis, causada por *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*), como herramienta suplementaria a las medidas de control se ha recurrido en ocasiones a la vacunación, empleando vacunas vivas atenuadas o inactivadas. Desde la primera aplicación con una cepa atenuada (Vallée and Rinjard, 2008) se han realizado numerosos estudios en todas las especies de rumiantes domésticos, y en todos los casos se obtuvieron similares resultados: la aplicación de las vacunas produjo una reducción en la sintomatología de los animales infectados, disminuyendo por tanto las pérdidas económicas producidas por la enfermedad; y los animales vacunados también eliminaron menores tasas de *Map* al ambiente, contribuyendo por tanto al descenso de la carga ambiental de la bacteria [entre los más recientes (Corpa et al., 2000; Garrido et al., 2007; Gwozdz et al., 2000; Kormendy, 1994; Patton et al., 2007; Reddacliff et al., 2006; van Schaik G. et al., 1996; Wentink et al., 1994)]; algunos inconvenientes menores descritos en estudios de vacunación son una mayor relajación respecto al mantenimiento de las medidas de manejo en explotaciones aplicando pautas de vacunación por una excesiva confianza en el efecto de la vacuna (Kalis et al., 2001); la aparición de lesiones en el punto de inoculación de la vacuna (Reddacliff et al., 2006; Windsor and Eppleston, 2006), si bien son mínimas si se administra correctamente (Eppleston and Windsor, 2007); y el riesgo de autoinoculaciones accidentales para el personal veterinario (Richardson et al., 2005; Windsor et al., 2005). Sin embargo, hay dos problemas asociados a la vacunación frente a paratuberculosis de mucha mayor importancia: en primer lugar, en ningún caso previno la infección por *Map*, manteniéndose por tanto ésta en el rebaño, y los animales vacunados continuaron excretando la bacteria al ambiente (Kalis et al., 2001). En segundo lugar, se ha descrito una interferencia provocada por la vacunación con las pruebas de diagnóstico de paratuberculosis (Kohler et al., 2001; Kormendy, 1994; Muskens et al., 2002; Spangler et al., 1991) y tuberculosis (Aranaz et al., 2000; Kohler et al., 2001; Muskens et al., 2002).

Por todo lo anterior, aun disminuyendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad y las pérdidas económicas derivadas de ésta, la vacunación no es una estrategia compatible con la erradicación de la paratuberculosis (Cocito et al., 1994; Emery and Whittington, 2004; Harris and Barletta, 2001; Kennedy and Benedictus, 2001). En países actualmente con programas de erradicación de tuberculosis los problemas de interferencia diagnóstica son especialmente graves, y solo serían evitables con el desarrollo de vacunas que permitieran la diferenciación entre animales vacunados de infectados (Muskens et al., 2002).

MYCOBACTERIUM LEPRAE

La enfermedad de mayor importancia a nivel de Salud Pública causada por una bacteria de este género, con la excepción de la tuberculosis, es sin duda la lepra, cuya naturaleza zoonótica todavía está en discusión pero de la que existen bastantes evidencias. Su origen resulta más complejo de establecer que el de la tuberculosis, ya que su agente causal, *Mycobacterium leprae*, tiene un rango de hospedadores muy limitado. Si, tal y como se ha mencionado anteriormente, la lepra es una enfermedad de emergencia relativamente reciente en el hombre, el patógeno debe haber existido previamente en algún otro hospedador o haber estado distribuido por el ambiente. La idea de una fuente de contagio ambiental como origen de la enfermedad es tan vieja como el propio descubrimiento de su agente causal, pero diversos estudios taxonómicos no han podido sustentar estas hipótesis, y no han podido encontrar evidencias de que este microorganismo haya derivado de alguna micobacteria saprofita.

El estudio de este patógeno se ha visto dificultado en gran medida por la dificultad que entraña su aislamiento en el laboratorio. Por ello, muchas hipótesis sobre sus características han sido formuladas basándose en lo observado en otras micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG, llevando a la conclusión de que su pared celular es similar a la que presentan éstas. Cabe destacar que el lípido dominante en la pared celular de *M. leprae* es el glicolípido fenólico PGL-1, dotando a la bacteria de una especificidad inmunológica (Scollard et al., 2006). Estudios realizados en los últimos años sugieren que el PGL-1 está implicado en la interacción de la bacteria con la laminina de las células de Schwann, lo que podría indicar que este lípido juega un papel en las interacciones entre el bacilo y los nervios periféricos de su hospedador (Ng et al., 2000).

Esta bacteria jamás ha podido ser cultivada en medios artificiales en el laboratorio, aunque puede mantenerse en un estado metabólico más o menos estable en cultivo axénico durante algunas semanas (Truman and Krahenbuhl, 2001). Por ello los trabajos sobre la propagación de la bacteria solo han podido ser realizados en modelos animales como el armadillo o el ratón. La comparación entre el genoma de *M. leprae*, secuenciado en su totalidad en 2001 (Cole et al., 2001), y el de *M. tuberculosis*, revela que la primera ha sufrido un proceso muy acusado de evolución reductiva, evidente por su reducido genoma (3.3 MB comparado con los 4.4 Mb de *M. tuberculosis*) y su menor contenido en G+C (58% frente a 66% en *M. tuberculosis*) (Brosch et al., 2000). En el genoma de *M. leprae* se han identificado 1614 ORFs en comparación con los 3993 potencialmente identificados en *M. tuberculosis*. Esta comparación también pone de manifiesto el sorprendente hallazgo de 1133 genes inactivados en *M. leprae* (perdidos por mutaciones, o pseudogenes) mientras que en *M. tuberculosis* tan solo se han identificado 6 (Brosch et al., 2000). Esto se traduce en el hecho de que el genoma de *M. leprae* tan solo codifica genes funcionales en alrededor de un 50% de su extensión, mientras que este porcentaje asciende a 90% en el caso de *M. tuberculosis*. El reducido panel de genes disponibles en *M. leprae* convierte esta bacteria en un modelo ideal para identificar el número de genes mínimo necesario para el parasitismo intracelular obligado.

La lepra ha recibido numerosos nombres a lo largo de la historia, pero resulta difícil precisar cuántos de ellos se referían a la enfermedad tal y como hoy la definimos. Los galenos griegos describieron la enfermedad por primera vez en el siglo III AC; es posible que la lepra entrara en Europa desde la India a lomos de los ejércitos de Alejandro Magno, que la habían conquistado en el 327 AC (Browne, 1977). En aquella época esta enfermedad emergente fue llamada “*elephantiasis Graecorum*”, para diferenciarla de la “*elephantiasis Arabum*” (la elefantiasis de etiología parasitaria que hoy conocemos). La lepra también recibió el nombre de “*leontiasis*” o “*satiriasis*” debido a las deformidades faciales a las que daba lugar, mientras que el término lepra quedaba reservado a ciertas afecciones de la piel como la soriasis. Sin embargo fue este término, “lepra”, el elegido para referirse a la enfermedad cuando el antiguo y el nuevo testamento fueron traducidos al griego. Este hecho pudo haber contribuido a aumentar la repugnancia tradicionalmente asociada a la lepra, ya que dicho término quedó definido como un sinónimo de corrupción en general, y a los pecadores de alma corrupta se les consideraba enfermos de lepra del alma (*leprosi animi*). De hecho, dado que el término *leproso* ha adquirido unas connotaciones claramente negativas (asociado en el imaginario común a falta de higiene) y siguiendo recomendaciones de la Organización

Mundial de la Salud, se reserva su uso al contexto histórico. Por el mismo motivo se ha propuesto denominar a la enfermedad “enfermedad de Hansen”.

Cuando Robert Koch reveló a la sociedad científica su descubrimiento del bacilo tuberculoso ya habían pasado algunos años desde que el noruego Gerhard Henrik Armauer Hansen (1814-1912) describiera el bacilo de la lepra tras observarlo en nódulos afectados por la enfermedad (el hallazgo se publicó en 1874, aunque la fecha exacta del descubrimiento se desconoce). En aquella época la lepra, además de ser endémica en países tropicales y subtropicales, aparecía en forma de epidemias en países tan alejados de estas zonas como Noruega. Sin embargo la incapacidad de Hansen para cultivar el bacilo hizo que no pudiera probar que eran efectivamente la causa de la enfermedad, y por tanto no recibió los mismos honores que Koch. *Mycobacterium leprae* se incluyó posteriormente en el género *Mycobacterium* ya que, al igual que el bacilo tuberculoso, resistía la decoloración con alcohol clorhídrico tras la tinción con ciertos colorantes. Por este motivo se denominó a todas estas bacterias “ácido-alcohol resistentes” (*saurefest*).

La búsqueda de compuestos con actividad frente a *M. leprae* ha sido especialmente complicada debido precisamente a esas dificultades para su cultivo *in vitro*. Sin embargo, antes incluso del descubrimiento de las primeras drogas anti-tuberculosas ya se habían descrito antes dos agentes con cierta eficacia terapéutica en el tratamiento de la lepra, el aceite de Chaulmoogra y la promina. Según una leyenda india, las propiedades del primero de estos compuestos frente al bacilo de la lepra podrían tener un origen divino: una pareja de príncipes afectados de lepra fueron desterrados al bosque, y allí los mismos dioses les indicaron que comieran el fruto del árbol de Chaulmoogra (*Hydnocarpus wightiana*), lo que hizo posible su cura, su regreso del destierro y su felicidad posterior. El primer medicamento con actividad frente a la bacteria utilizado a gran escala fue la dapsona, desarrollada en los años cuarenta, cuyo principal inconveniente radicaba en el largo periodo de tiempo que debía ser aplicada en el enfermo (años o incluso durante toda la vida). La aparición en los años 60 de resistencias frente a la dapsona motivó la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anti-*M. leprae*, llevando al diseño de terapias multidroga (al igual que en el caso de la tuberculosis) basadas en la aplicación de dapsona, rifampicina y clofazimina; en 1981 la OMS recomendó esta combinación para el tratamiento de la lepra, ya que garantiza la eliminación del patógeno y la curación del paciente si se aplica antes de llegar a fases muy avanzadas de la enfermedad. En la actualidad, la distribución de esta enfermedad a nivel mundial ha cambiado en gran medida gracias a la introducción de las terapias basadas en la combinación de varios compuestos,

pasando de 5.2 millones de casos en 1985 a 805.000 en 1995 y 286.000 a finales del 2004 según datos de la OMS (2005).

Vacunación frente a la lepra

La OMS posee un grupo de control específico para esta enfermedad causada por *M. leprae*. Una de las tareas de este grupo de expertos es la de establecer las pautas a seguir para mejorar las estrategias de control de la enfermedad. Entre las medidas de profilaxis se ha probado la vacunación. De hecho, la vacunación con BCG puede impedir el desarrollo de la lepra y es probable que, la vacunación neonatal con BCG para prevenir tuberculosis haya podido ser la causa del descenso de la prevalencia de la lepra. Como ocurre en el caso de la tuberculosis, el grado de protección frente a la lepra conferido por la BCG varía entre poblaciones, aunque las causas de esta variabilidad se desconocen (Merle et al., 2010).

La búsqueda de una vacuna moderna basada en sub-unidades se ha visto facilitada por la secuenciación del genoma de *M. leprae*, aunque los avances están muy por debajo de los conseguidos para el caso de la tuberculosis. Una de las principales razones para justificar este retraso es la relación coste-beneficio, pues la prevalencia de la lepra es muy inferior a la de la tuberculosis y la incidencia ha ido decayendo. Además, al contrario que en la tuberculosis, no existen modelos animales aptos para los estudios (la patogénesis en ratón es atípica y el armadillo no es práctico para pruebas vacunales) (Gillis, 2007; Raman et al., 2009). Si se llegase a encontrar una vacuna más específica frente a la lepra que sustituyese en lugar de potenciar a la actual BCG, la actual protección frente a la lepra conferida por la BCG se perdería. Es, por tanto, necesario investigar más en el desarrollo de vacunas frente a la lepra y para ello puede ayudar los hallazgos derivados del desarrollo de vacunas frente a la tuberculosis (Gillis, 2007).

MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Aunque, debido a la importancia de Salud Pública y Sanidad Animal por su potencial zoonótico y por las enfermedades que causan las bacterias de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* ambas han concentrado la mayor parte de investigaciones desarrolladas en el campo de las micobacterias, varias especies no integradas en estos grupos merecen una mención aparte debido a su importancia en medicina humana y veterinaria. Ya a principios del siglo pasado pronto se hizo evidente que, además del bacilo de la tuberculosis bovina, otros tipos de bacilos ácido-alcohol resistentes estaban distribuidos en el ambiente, algunos de ellos dando lugar a enfermedades en los animales (fundamentalmente en aves y animales poiquilotermos). Sin embargo, debido a la enorme atención suscitada por el bacilo tuberculoso, estas otras bacterias recibieron una atención escasa, y hasta mediados del siglo XX no empezaron a ser objeto de investigaciones científicas, a raíz de la descripción de la enfermedad en el hombre por algunas de estas bacterias, como *M. ulcerans* (MacCallum, 1948) y *M. marinum* (Linell y Norden, 1954). En las últimas décadas podemos hablar de un descenso en las infecciones causadas por las micobacterias patógenas obligadas (complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae*...) acompañado de un incremento de las infecciones debidas a micobacterias oportunistas en los países desarrollados, producto de la combinación de una serie de factores:

- Un incremento en la población con un sistema inmune menos capaz de responder a las infecciones por estas bacterias (debido a la aparición o mayor incidencia de enfermedades inmunosupresoras como el SIDA o el cáncer, a la administración de tratamientos que provocan inmunosupresión, al incremento en la edad media de la población en los países desarrollados...)

- Un mayor conocimiento de otras especies de micobacterias potencialmente patógenas, junto con una mejora en las técnicas diagnósticas para su identificación.
- Cambios en el comportamiento de la población, llevándolos a ocupar nichos tradicionalmente ocupados por micobacterias atípicas; posibles efectos de cambios en el medio ambiente que afecten la ecología de estas especies bacterianas.
- Mejora de los tratamientos higienizantes para el agua, que pueden conducir a una selección de especies de micobacterias resistentes a estas condiciones adversas (el uso de ozono o cloro para el tratamiento del agua puede favorecer el crecimiento de bacterias de la familia *Actinomyces*, incluyendo al género *Mycobacterium*).

La dinámica de infección por estas micobacterias atípicas es muy diferente de la observada en el caso de los “patógenos profesionales” del género, ya que la transmisión entre personas de los mismos no ha sido documentada. Por tanto, la fuente de infección para el hombre sería siempre ambiental, y dada la ubicuidad de muchas de estas especies, un sinfín de elementos podrían actuar como tales. La capacidad de resistencia de las micobacterias no tuberculosas a la cloración y su capacidad de formar biofilms hace que los sistemas de canalización de agua puedan convertirse en unos caldos de cultivo perfectos para estas bacterias, a pesar de su menor tasa de replicación en comparación con otra posible flora competidora. Su capacidad para sobrevivir en ausencia de niveles elevados de nutrientes también las dota de otra ventaja competitiva para la colonización de estos ambientes, al igual que su habilidad para sobrevivir a la fagocitosis por protozoos ambientales. No obstante, existen otras posibles fuentes de infección, como la propia comida. En los últimos años se ha ido produciendo una interacción entre la ecología de estas micobacterias y la actividad del hombre, ya que la población se sobre-expone por la realización de ciertas actividades (baños frecuentes en piscinas naturales o artificiales, duchas, bañeras; como ya se ha dicho, tratamientos que conducen a la selección de las micobacterias). El hecho de que las enfermedades causadas por estas micobacterias no sean de declaración obligatoria complica mucho su estudio, ya que solo existen datos aproximados de su prevalencia e incidencia en la población general. En lo que hace referencia a España, de entre especies más relevantes de entre estas micobacterias atípicas o ambientales (excluyendo el complejo *M. avium*) cabe destacar *Mycobacterium kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*.

M. kansasii, descrita por primera vez en 1953 por Buhler y Pollak como un “bacilo amarillo”, es una especie de crecimiento lento que puede dar lugar

a cuadros pulmonares y extrapulmonares en el hombre (septicemias, procesos cutáneos, pericarditis...). Su incidencia ha aumentado en varios países industrializados, y en ocasiones da lugar a un cuadro clínico y radiológico parecido al de la tuberculosis. De forma ocasional *M. kansasii* se ha aislado a partir de muestras de suelo, polvo o fuentes naturales de agua, pero se considera que la principal fuente de infección (y su reservorio fundamental en la naturaleza) son las canalizaciones de agua potable. La manifestación clínica más frecuente a la que da lugar esta micobacteria es una afectación pulmonar crónica de presentación variable e inespecífica. La presencia de enfermedades pulmonares predisponentes (tuberculosis, COPD, tabaquismo, bronquiectasias) puede dificultar su diagnóstico y la interpretación de los síntomas.

Otro grupo de enfermedades claramente asociadas con el agua como fuente de infección son las micobacteriosis de las piscinas (o enfermedad de las piscinas), causadas por *M. marinum* fundamentalmente pero también por *M. fortuitum* y *M. chelonae* en menor medida. *M. marinum* es la principal micobacteria patógena aislada en peces, y es capaz de infectar un amplio rango de especies (se considera que todas las especies deben ser consideradas como potencialmente susceptibles a la infección). *M. fortuitum*, por su parte, es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente que puede aislarse a partir de las escamas de peces sanos pero también puede causar granulomas y septicemias. *M. chelonae*, por su parte, tiene un rango de hospedadores limitado fundamentalmente a las especies de salmónidos de aguas frías, aunque recientemente también se ha aislado a partir de muestras de peces de aguas templadas (rodaballos) (dos Santos et al., 2002). Los primeros casos de “enfermedad de las piscinas” reportadas en la literatura datan de 1939 (Suecia) y 1951 (Estados Unidos), siempre en forma de lesiones granulomatosas en piel. En la actualidad, debido a los tratamientos de higienización de las piscinas, estos cuadros son extremadamente infrecuentes, de modo que la “enfermedad de las piscinas” ha pasado a ser la “enfermedad de las peceras” o del “cuidador de peces”, ya que se observan en personas a cargo de acuarios (normalmente de pequeño tamaño), aunque también en personas que realizan actividades acuáticas (pesca, navegación o natación en aguas naturales). La patología por *M. marinum* también se considera una enfermedad profesional asociada a personas a cargo de acuarios (tiendas de mascotas, pequeñas plantas de producción piscícola). La infección puede adquirirse por lesiones cutáneas producidas directamente por los peces (mordiscos, heridas con las aletas) pero en la mayor parte de los casos tiene lugar por cortes o lesiones asociadas al manejo de los acuarios (limpieza, cambio de agua...), y tiene un curso lento (de tres semanas hasta nueve meses), observándose lesiones cutáneas en forma de placas granulomatosas y noduloulcerativas. También pueden obser-

vase infecciones en tejidos más profundos, llegando al tendón y el hueso en ocasiones. La diseminación sistémica es muy poco frecuente (estas micobacterias no crecen bien a 37°C) aunque sí se ha observado en pacientes inmunocomprometidos. El diagnóstico se ve complicado por lo inespecífico del cuadro clínico, y puede confirmarse mediante biopsias de tejido para su análisis histológico y bacteriológico. Las exigentes necesidades de las micobacterias para su crecimiento in-vitro hace que muchas de estas infecciones no se diagnostiquen correctamente, pasando inadvertidas en el análisis microbiológico. En ocasiones las lesiones se resuelven por sí solas (en caso de cuadros leves), pero en caso de cuadros más severos es importante realizar un diagnóstico y aplicar un tratamiento (etambutol, rifampicina o estreptomycin, entre otros antibióticos) para minimizar el riesgo (pequeño, pero real) de que la infección progrese y alcance tejidos más profundos). No se ha establecido un tratamiento uniforme para estas infecciones, por lo que es importante realizar tests de susceptibilidad en las bacterias aisladas del paciente siempre que sea posible, aunque la naturaleza “fastidiosa” de estas micobacterias dificulta la realización de estas pruebas, y en la actualidad no hay un protocolo estandarizado para determinar su resistencia a los antibióticos de elección.

Aportaciones de la veterinaria en la lucha frente a la tuberculosis humana y animal

Los principales agentes etiológicos de la tuberculosis en los animales, de la que al menos existen referencia escrita desde el año 40 de nuestra era son, por este orden, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis* (Aranaz et al., 2003b; Crawshaw et al., 2008b; dos Santos et al., 2002; Aranaz et al., 1999b; Cadmus et al., 2009b; Coleman and Cooke, 2001; Liébana et al., 1995; Rodríguez et al., 2009a; Sanson, 1988; Schiller et al., 2010).

Actualmente es cierto que la tuberculosis humana de origen zoonótico en los países desarrollados no llega al 1% de los casos totales de tuberculosis gracias a la práctica generalizada de pasteurizada la leche y la inspección veterinaria de los productos de origen animal (Grange, 2001), siendo la mayoría de los casos debida a reactivaciones de procesos antiguos o a personas infectadas en países sin programas de control. Sin embargo en los países en vías de desarrollo donde la tuberculosis humana y animal es endémica la situación no puede ser muy distinta a la que se producía en Estados Unidos a principios del siglo XX donde una de cada 9 muertes se debía a la tuberculosis y de estas entre un 10 y un 20% eran de origen animal (Olmstead L.A. and Rhode P.W., 2004).

Las descripciones de procesos patológicos en los animales que permiten reconocer la existencia de tuberculosis en los animales han sido muy frecuentes en los últimos siglos. Aunque se intuía su carácter zoonótico, hasta 1902 no se consiguió demostrar taxativamente la evidencia, al aislar Ravenel el agente más frecuentemente implicado en la tuberculosis bovina, *M. bovis* a partir de niños con meningitis tuberculosa. Previamente muchos investigado-

res vincularon la tuberculosis en hombre y animales. desde los trabajos de Klenke, en la Alemania de 1797 uniendo el consumo de leche de vaca con la tuberculosis humana, pasando por los trabajos de Gurlt (1831) Hering (1849) Fuchs (1859) que consideraron la tuberculosis pulmonar de los bovinos esencialmente igual a la humana hasta los trabajos de Villemin que en 1868 postuló el carácter zoonótico del agente causal de la tuberculosis ,planteando la teoría de que la tuberculosis humana y el mal perlado de los bovinos constituía esencialmente un mismo proceso y que este era de carácter infeccioso al reproducir la enfermedad tras la inoculación de material patológico de hombres y vacas en animales de experimentación.

Aunque hasta 1970 *M.bovis* no fue oficialmente reconocido como especie bacteriana distinta de *M. tuberculosis*, ya en la primera década del siglo XX existía un consenso generalizado de que la tuberculosis bovina era un proceso distinto de la tuberculosis humana, fundamentalmente debido a los trabajos de Theobald Smith en 1898 y de que esta, puede diseminarse libremente entre animales y hombres y viceversa, esto es *M. bovis* es un agente zoonótico, y que a pesar de ser distinto del agente productor de la tuberculosis humana, produce en el hombre una enfermedad clínicamente indistinguible de la que produce *M. tuberculosis*.

Esta creencia inicial, basada en la hipótesis de que el bacilo causante de la tuberculosis humana y animal era el mismo evolucionó con los descubrimientos de diferencias pequeñas entre ambas bacterias por parte de Smith en 1898 y llevó incluso a Koch a afirmar en una conferencia sobre tuberculosis en Londres en 1901 que el agente causal de la tuberculosis animal no representaba una amenaza para el hombre y, por tanto, no había necesidad de intentar controlar la enfermedad en el ganado, lo que originó una gran polémica con los profesionales de la Sanidad Animal. Afortunadamente las palabras del genial investigador no convencieron y se constituyó una comisión para estudiar el asunto a través de un trabajo experimental, en lugar de mediante la valoración de la opinión de expertos en el tema, adoptando así una aproximación totalmente novedosa y sin precedentes. Dicha comisión concluyó en 1911 que la enfermedad animal sí representaba una amenaza para la salud humana. Por desgracia, aunque solo hicieron falta alrededor de 10 días tras las palabras de Koch para formar la comisión, tuvieron que transcurrir más de 30 años para que sus conclusiones tuvieran consecuencias prácticas en Europa: los planes de control voluntario se introdujeron por primera vez en 1935, momento en el cual el 40% del ganado bovino en Gran Bretaña presentaba lesiones compatibles con tuberculosis. Estos planes de control, basados en el análisis de todos los animales mediante la prueba de la tuberculina y el sacri-

1865	Jean-Antoine Villemin demuestra que la tuberculosis es contagiosa
1882	Robert Koch descubre el bacilo tuberculosis mediante una técnica de tinción, permitiendo la detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
1884	Se establece el primer sanatorio para tuberculosos en los Estados Unidos
1890	Robert Koch desarrolla la tuberculina, en un intento fracasado de usarla como vacuna
1890/91	Se aplica la tuberculina para el diagnóstico en Dinamarca y Rusia por B. Bang y W. Gutmann respectivamente
1892	Leonard Pearson introduce el test de la tuberculina en Pensilvania
1895	Se empiezan a utilizar las primeras máquinas de pasteurización de la leche (EEUU?)
1898	Theobald Smith distingue las formas bovina y humana del bacilo tuberculoso (<i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i>)
1901	Robert Koch sostiene equivocadamente que la tuberculosis bovina no representa una amenaza para la salud humana
1902	M. P. Ravenel aísla el microorganismo bovino de un niño con una meningitis tuberculosa
1904	Se funda la asociación nacional para el estudio y prevención de la tuberculosis en Estados Unidos, la primera organización sanitaria nacional y voluntaria enfocada a la lucha frente a una enfermedad determinada
1906/09	Se introduce el primer plan de testado y sacrificio en el distrito de Columbia (EEUU), que lleva a la conclusión en la siguiente década de que la tuberculosis bovina es erradicable
1908	Albert Calmette y Jean-Marie Camille Guérin, del instituto Pasteur, desarrollan la vacuna BCG, ensayada en personas por primera vez en 1921 con eficacia limitada
1908	Se aprueba en Chicago la primera ley municipal haciendo obligatoria la pasteurización de la leche (salvo aquella proveniente de vacas negativas en la prueba de la tuberculina)
1917	Se inicia el programa de lucha de frente a la tuberculosis bovina a nivel nacional en EEUU
1940	California se convierte en el último estado en el que se declara la tuberculosis bovina “enfermedad controlada”
1943	Selman Waksman descubre la primera droga capaz de destruir el bacilo tuberculoso, la estreptomycinina

Tabla 2. Secuencia temporal de la “teoría del germen infeccioso” para la tuberculosis

ficio de los reactores con una compensación económica, se transformaron en obligatorios en 1950.

Muy distinta fue la situación en Estados Unidos, donde los informes de la “*Royal Commission On Tuberculosis*” informando en 1895 de la contagiosidad del bacilo bovino, y posteriormente (1898) del peligro para la salud humana de los productos derivados de los animales enfermos de tuberculosis, llevaron a considerar las lecherías, carnicerías y establos como zonas de riesgo potencial para la Salud Pública, prohibiéndose la venta de leche y carne proveniente de vacas infectadas. En 1902 se consiguió demostrar taxativamente la evidencia, al aislar Ravenel el agente más frecuentemente implicado en la tuberculosis bovina, *M. bovis* a partir de niños con meningitis tuberculosa. El citado aislamiento de Ravenel y el excelente trabajo de Griffith para la británica “*Royal Commission On Tuberculosis*” en 1907, en el que taxativamente se afirmaba la patogenicidad del agente de la tuberculosis bovina para distintas especies de animales (incluyendo primates) y el hombre y el riesgo del consumo de productos derivados de animales enfermos (detectando la presencia de la bacteria en la leche de vacas que no presentaban lesiones en la ubre) así como el aislamiento de *M. tuberculosis* (bacteria con muy baja virulencia para los bovinos) de productos animales cambiaron el panorama y produjeron un efecto hasta ese momento nunca visto, sentando las bases en muchos países del inicio de una verdadera salud pública veterinaria (*Higia pecoris salus populi*) y constituyendo el inicio de los programas de control de las enfermedades transmisibles de los animales al hombre a través del control de los productos de origen animal mediante la inspección en el matadero y tratamiento en las centrales lecheras.

El descubrimiento de Koch dio lugar a nuevas investigaciones para el desarrollo de una terapia contra la enfermedad que pudiera sustituir a los extraños tratamientos empleados hasta la fecha (desde el consumo de leche materna, a ser posible directamente del pecho de la matrona a la mezcla de heces de paloma y sangre de comadreja sugerida por John de Gaddesden (1280-1361) en el siglo XIV). En este sentido, los esfuerzos de Koch por desarrollar una cura casi arruinaron su reputación: a raíz de sus observaciones en cobayas, Koch dedujo que un concentrado del medio en el que había crecido el bacilo tuberculoso, debidamente esterilizado, podía dar lugar a una respuesta necrótica local capaz de destruir el bacilo. La inyección de este compuesto, la “vieja tuberculina de Koch”, dio lugar a reacciones adversas importantes en varios pacientes tratados. Aunque estos experimentos no condujeron a la obtención de una cura frente a la enfermedad sí constituyeron la primera descripción de la reacción de hipersensibilidad de base celular, base sobre la que Clemens von Pirquet establecería el test de la tuberculina (1874-1929).

Como en cualquier otra zoonosis, para su eliminación en el hombre es necesario su control en el reservorio animal, y la aplicación sistemática de programas de erradicación de la enfermedad en el ganado ha contribuido a la disminución de casos en el hombre. La tuberculosis debido a *M. bovis*/*M. caprae* sigue siendo una enfermedad humana relevante en aquellas regiones en las que la tuberculosis bovina no está sujeta a planes de control, suponiendo además un riesgo ocupacional para granjeros, personal de mataderos o veterinarios en contacto estrecho con animales potencialmente infectados. Según la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria, el 94.8% de los 115 casos de tuberculosis por *M. bovis* detectados en 2009 se encontraba en Alemania, Irlanda, Holanda, Reino Unido y España. Muy distinta era la situación a principios del siglo pasado, cuando los casos de tuberculosis humana debido a *M. bovis* de origen animal eran mucho más frecuentes, y en cuya lucha el control de la enfermedad en el reservorio animal resultó fundamental. Las vías de transmisión de las bacterias del complejo tuberculosis desde los animales al hombre son la gastrointestinal, la respiratoria y la directa por contacto del material infeccioso con mucosas o con heridas. En esos momentos de primeros años del siglo XX en los países industrializados las personas se infectaban fundamentalmente tras la ingestión de leche no pasteurizada procedente de vacas tuberculosas, como quedó demostrado en las experiencias de Griffith, dando lugar a lesiones típicamente extrapulmonares fundamentalmente en niños. La afección granulomatosa de los linfonodos cervicales que se conocía como escrófula, o la “verruca de carnicero”, producida como consecuencia de la infección cutánea en estos profesionales, eran muy frecuentes, como nada raras eran las tuberculosis intestinales de articulaciones o las meningitis tuberculosas.

La adopción de drásticas medidas como la inspección de la carne, la prohibición de ventas de productos de animales tuberculosos y sobre todo, la pasteurización de la leche, puesta en marcha masivamente entre los últimos años del siglo XIX y primeros del XX por parte de los países más avanzados de la época (Reino Unido, países nórdicos y Estados Unidos) significaron una dramática reducción de los casos de tuberculosis de origen zoonótico, fundamentalmente de las formas extrapulmonares. Tanto es así que la pasteurización ha sido considerada como uno de los éxitos de la salud pública más importantes de la historia y uno de los avales para continuar y profundizar en la inspección y control de los alimentos que ha hecho posible reducir significativamente la diseminación de las enfermedades infecciosas de los animales al hombre (cabe recordar que el 60% de las enfermedades infecciosas humanas tienen su origen en los animales y que las emergentes lo son en su mayoría) (Fairchild and Oppenheimer, 1998).

A pesar de que la contribución veterinaria en este aspecto fue muy importante no fue la única, y a partir del momento en el que se demuestra el carácter zoonótico de la tuberculosis y que la mayor fuente de ésta para el hombre eran los bovinos infectados, los países que estaban liderando el movimiento para el control de esta zoonosis decidieron implementar las medidas con otra actuación hasta ese momento nunca practicada. La erradicación de la enfermedad en el ganado bovino: el país que podemos considerar pionero en aplicar alguna forma de control fue Finlandia, que ya en 1889 inicia actuaciones al respecto. En 1890, el genial Robert Koch, intentando preparar una vacuna frente a la tuberculosis, desarrolla la herramienta diagnóstica que ha sido básica para el diagnóstico, la acometida y desarrollo de todos los programas de control de la tuberculosis en todas las especies hasta este momento. Sorprende una vez más que tuviera que transcurrir casi un siglo para desarrollar otras técnicas complementarias que, en ningún caso, han podido desplazar totalmente la prueba de la intrademorreacción.

En 1890, otro gran veterinario, Bernhard Bang, el descubridor de la *Brucella abortus*, aplica la nueva “vacuna“ desarrollada por Koch en Dinamarca y comprueba las posibilidades que este reactivo tiene para el diagnóstico de la tuberculosis en animales asintomáticos, desarrollando una estrategia que todavía lleva su nombre. Inmediatamente se aplicó por Gutmann en Rusia y Pearson, un alumno del laboratorio de Koch, en Estados Unidos. Hasta ese momento los veterinarios solo podían diagnosticar aquellos animales en fases avanzadas de la enfermedad, lo que constituía menos de un 10% de los animales infectados, y lo que era más importante, eran incapaces de diagnosticar el 90% de los animales infectados, que eran asintomáticos pero que sin embargo podían contagiar la enfermedad.

En 1917, 27 años después de que Bang propusiera un sistema de erradicación, Estados Unidos implanta un controvertido programa de erradicación basado en el diagnóstico de la tuberculosis con tuberculina y el sacrificio obligatorio de los reaccionantes positivos (*test-and-cull strategy*) (Olmstead L.A. and Rhode P.W., 2004) sin una compensación total de las pérdidas a los ganaderos. Esto representó un concepto muy novedoso, ya que los dueños de los animales infectados sufrían una expropiación con base en criterios de salud pública. Los resultados y los resultados y las cifras de este programa todavía hoy nos parecen ingentes. Entre 1917 y 1940 se aplicaron 400 millones de dosis de tuberculina y se sacrificaron casi 4 millones de animales de una cabaña (datos acumulados durante este periodo) de 66 millones. Esta medida fue complementada con la obligatoriedad de pasterizar la leche (iniciada en 1895 en Estados Unidos pero prácticamente inexistente al inicio del programa y que

cubría ya en 1936 aproximadamente el 98% de la leche consumida en las grandes ciudades)

El programa tuvo un enorme éxito: en 1941 la prevalencia había descendido desde el 5% (10% en el ganado lechero) a menos del 0.5%. La tuberculosis humana de origen zoonótico era prácticamente inexistente, los ganaderos en principio, muy reacios, habrían percibido unos retornos económicos estimados 10 veces superiores a la inversión y, lo que es más importante, se estima que el programa permitió entre 1917 y los años precedentes a la segunda guerra mundial salvar más de 25.000 vidas al año. Este programa fue básicamente el que progresivamente se fue implantando en Europa con 20-30 años de diferencia, y se aplicó en España a partir de 1966.

En lo que hace referencia a España, Las primeras actuaciones de lucha frente a la tuberculosis bovina se inician en España a principios de los años 50. El 19 de junio de 1950 se inauguró, de manera simbólica, la primera campaña oficial de saneamiento ganadero en el Ayuntamiento de Ribamontán del Mar (Santander), realizándose en una ganadería de la localidad de Suesa la prueba de la tuberculina según el método de Bang (Cuezva Samaniego, 1966). Posteriormente se extiende la campaña al País Vasco, Asturias y León, donde se concentraba el ganado de aptitud lechera. En 1.965 se establece, mediante la Orden de 24 de mayo, un Plan Nacional de Lucha contra la tuberculosis y la brucelosis bovinas, centrado principalmente en los principales núcleos de vacuno lechero del norte y centro de España. Estos primeros pasos de los programas se centraron en chequeos diagnósticos con fines estadísticos, indicando una incidencia en animales de en torno al 20%. Tras la entrada de nuestro país en la CEE, en 1.987 España presenta un Programa de Erradicación Acelerada, de acuerdo con las Directivas 77/391/CEE y 78/52/CEE y la Decisión 87/58/CEE, y que fue aprobado el 15 de mayo de este año mediante la Decisión 87/292/CEE. Los Programas Nacionales de Erradicación de la Tuberculosis Bovina han sufrido diversas modificaciones y orientaciones a lo largo de los años, con el fin de adaptarse a los cambios acontecidos en el manejo de los animales y la estructura de las explotaciones, en los flujos comerciales y en el conocimiento científico de las distintas formas de la enfermedad (asesoramiento, diagnóstico, epidemiología, patogenia...).

Los Programas Nacionales de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2006-2010 supusieron un cambio cualitativo en el planteamiento de los objetivos, de forma que sentaron las bases para garantizar actuaciones continuadas en el tiempo bajo un enfoque plurianual, establecido en 5 años. Un pilar principal de estos programas fue incrementar paulatinamente la sensibilidad en el

diagnóstico, tanto a nivel de rebaño como individual. El incremento en la frecuencia de las pruebas anuales, tanto en rebaños no calificados como en rebaños calificados de zonas de alta prevalencia; la realización de pruebas previas a los movimientos de animales; la realización de protocolos normalizados de trabajo para la realización de las pruebas diagnósticas; la intensificación de las inspecciones sin previo aviso sobre los equipos de campo; la aplicación de criterios severos en la interpretación de la IDTB simple o el incremento paulatino de las pruebas complementarias de gamma-interferón en rebaños positivos confirmados han constituido las medidas principales para incrementar la sensibilidad. Otras medidas adicionales introducidas paulatinamente para gestionar los factores identificados han sido medidas de gestión de posibles reservorios silvestres o la integración del sistema de vigilancia en mataderos. El enfoque plurianual permite establecer una serie de medidas constantes a lo largo de los años, aunque en función de la evolución de la enfermedad puede ser necesario implementar medidas adicionales. Por ello, para la elaboración de este programa se han tenido en cuenta, además de las distintas partes implicadas en la ejecución del programa (Comunidades Autónomas, Sectores Productivos, Asesores Científicos), las recomendaciones de la misión de la FVO DG (SANCO) /2008-7792 y del subgrupo de la Tuberculosis Bovina de la Task- Force para España resultantes de la reunión celebrada en Sevilla en 2007, así como el documento de trabajo SANCO/10200/2006 de dicho subgrupo “Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la UE”.

En los años 30 del siglo pasado, hasta un 6% de las muertes por tuberculosis en Gran Bretaña eran atribuidas a *M. bovis*, lo que se achacaba a la elevada prevalencia registrada en aquella época en el ganado (15-20%). En la actualidad no se han registrado nuevos casos en ese país a pesar de la reemergencia de tuberculosis bovina que están experimentando las Islas Británicas. En España, un estudio realizado a nivel nacional en el que participamos describió que el 1.9% y el 0.3% de los casos de tuberculosis en el hombre eran causados por *M. bovis* y *M. caprae* respectivamente. Estudios de caracterización molecular han demostrado que los genotipos hallados en los pacientes coinciden con los más abundantes en el reservorio animal en nuestro país, lo que podría sugerir un vínculo epidemiológico entre la enfermedad en el hombre y los animales, como se observó en Gran Bretaña. Estudios anteriores ya identificaron el contacto con el ganado como la fuente de infección más probable en el caso de la tuberculosis humana por *M. bovis* (Grange, 2001; Prodinger et al., 2002). Otros estudios realizados en países de Centroeuropa y Europa oriental e Italia también han detectado la presencia de *M. bovis*/*M. caprae* en el hombre (Grange, 2001; Kubica et al., 2003; Lari et al., 2006). Sin embargo, *M. caprae* no ha sido descrito nunca fuera de la

Europa continental, con la excepción de un caso detectado en Australia en un paciente de origen europeo (Sintchenko and Gilbert, 2007) y de una vaca en Algeria (Sahraoui et al., 2009).

Diversos estudios realizados en los Estados Unidos, países escandinavos e Inglaterra describieron una afectación pulmonar en aproximadamente el 50% de las reactivaciones en pacientes infectados, mientras que los restantes casos cursaban con afectación del tracto genitourinario (25%) y otras localizaciones (25%). *M. bovis* causa fundamentalmente lesiones extra-pulmonares en el hombre en países en vías de desarrollo (Cosivi et al., 1998), y un estudio realizado en Tanzania detectó que un 10% de las tuberculosis extra-pulmonares estaban causadas por *M. bovis*. En un estudio longitudinal realizado en la Toscana italiana durante cuatro años se identificó *M. bovis* como el agente causal del 3.7% de las tuberculosis extra-pulmonares y del 1% de los casos pulmonares (Lari et al., 2009). *M. caprae*, en cambio, es capaz de dar lugar a una gran variedad de cuadros en el hombre, incluyendo infecciones en pulmón, lupus vulgaris, tuberculosis cutánea, infecciones urinarias y pericarditis.

Se asume de forma generalizada que *M. bovis*/*M. caprae* es menos virulento que *M. tuberculosis* en el hombre, y que existe un menor riesgo de transmisión entre personas, aunque no se ha demostrado científicamente. Esta creencia choca con el mayor brote por *M. bovis* registrado en España durante los años 90, causado por una cepa MDR de *M. bovis* con una elevada mortalidad, que infectó más de 100 pacientes y a algunos casos secundarios en distintos hospitales (Guerrero et al., 1997; Rullán et al., 1996). Con posterioridad se han venido registrando de forma esporádica algunos nuevos casos debidos a la misma cepa (Ramos et al., 2004; Robles et al., 2002). También se han descrito algunos casos de transmisión de *M. bovis* y *M. tuberculosis* del hombre al ganado bovino (Romero et al., enviado).

Las nuevas técnicas de caracterización molecular desarrolladas en las últimas décadas han permitido comparar de forma eficiente aislados de origen humano y animal, permitiendo así la realización de estudios epidemiológicos con un mayor poder de definición y demostrando la transmisión de la tuberculosis entre los animales y el hombre y, en muchos casos, determinando el origen de la infección (Cvetnic et al., 2007a). Sin embargo, durante bastante tiempo el flujo de información entre las autoridades de Salud Pública y Sanidad Animal ha sido ineficiente debido a la ausencia de una estrategia en común entre ambos sectores. Afortunadamente, esta situación se está revisitando en los últimos años, toda vez que el control de las zoonosis resulta altamente beneficioso para el hombre y el ganado (Zinsstag et al., 2007).

Conclusión

Si se tienen en cuenta todos los avances médicos que han tenido lugar en los últimos 100 años resulta del todo incomprensible constatar la importancia que estas dos enfermedades, viejas conocidas de la humanidad, siguen teniendo en nuestros días, y el mortal peaje que nos siguen cobrando. Todavía resulta más incomprensible si estos datos se analizan teniendo en cuenta que las altas tasas de mortalidad originadas por la tuberculosis han sido constantemente altas a lo largo de la historia del hombre. Quizá una de las razones para ello es que en los últimos 50 años, a partir del advenimiento de la quimioterapia, los países desarrollados (sus gobiernos y clase dirigente) han considerado que eran enfermedades superadas o al menos bajo control, y que habían pasado a ser patologías circunscritas a aquellos países en vías de desarrollo. Sin embargo, la irrupción del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y la aparición y generalización de cepas multirresistentes y extremadamente resistentes para las que puede no existir ninguna alternativa terapéutica, sumiendo súbitamente a los enfermos y a los sistemas sanitarios en la era pre-antibiótica ha sacudido la percepción que de estas enfermedades teníamos hasta el momento.

Según datos de la OMS, actualmente existen en el mundo dos mil millones de personas aproximadamente que están infectadas de tuberculosis (un tercio de la población mundial) y, de estas personas, una de cada 10 acabará desarrollando la enfermedad. En el año 2009 murieron de tuberculosis 1,7 millones de personas, especialmente en los países en desarrollo, donde jamás llega a identificarse la especie causante de la enfermedad. Además, hubo 9,4 millones de casos nuevos, lo que indica que la tasa de incidencia está disminuyendo pero a un ritmo muy lento (menos del 1% anual). Especialmente gra-

ves son los casos de tuberculosis multirresistente (multidrug-resistant, MDR) y extremadamente multirresistente (extensively drug-resistant, XDR), debidas a cepas resistentes a los fármacos de segunda línea y de las que se han confirmado casos en más de 50 países. Desde 1995 se han conseguido tratar con éxito 41 millones de pacientes y se han salvado 6 millones de vidas. Desde este momento y hasta 2015 podrían salvarse otros 5 millones de vidas si se consiguiese financiar y ejecutar íntegramente el Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2011-2015. Además, la reducción de las tasas de prevalencia y mortalidad de la tuberculosis está contemplado dentro de los Objetivos de desarrollo del Milenio (ODM. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo).

En España, en el año 2009 hubo una tasa de mortalidad debida a tuberculosis (excluyendo a los infectados por VIH) del 0,7 por cada 100.000 habitantes y se detectaron un total de 89.000 casos (Datos de la OMS, 2010). No existe demasiada información acerca de los miembros del MTBC causantes de la tuberculosis en humanos, ya que, generalmente, para confirmar la infección o con fines estadísticos, basta con determinar que se trata de una especie incluida en dicho complejo. A pesar de esto, existen estudios publicados que han caracterizado las cepas aisladas en diferentes hospitales de nuestro país. Concretamente, en un estudio llevado a cabo en el periodo 2004-2007, de las 110 cepas aisladas de humanos y seleccionadas en base a diferentes criterios (personas con contacto estrecho con animales domésticos como ganaderos, personas de ambientes rurales con contacto con fauna silvestre o mayor probabilidad de haber consumido leche sin pasteurizar, etc.), 89 fueron identificadas como *M. bovis*, 21 como *M. caprae* y en un 73% de los casos se llegó a relacionar epidemiológicamente la infección por estas especies con la ocupación y ambiente de trabajo de la persona afectada (ganaderos y agricultores principalmente) y que procedían de regiones donde la tuberculosis era endémica en animales de producción (Rodríguez et al., 2009b). A la inversa, nuestro grupo, empieza a detectar cada vez con más frecuencia, animales infectados por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras micobacterias de origen humano, que en los casos en que no estén debidamente controlados, pueden a su vez diseminar la infección entre la población humana. Afortunadamente en nuestro país, la colaboración entre los responsables de la salud humana y animal, está funcionando adecuadamente y estos brotes se neutralizan rápidamente. No obstante resulta preocupante el pensar que es lo que puede estar pasando en aquellos países que no tengan ni la capacidad técnica ni económica para llevar a cabo estos exigentes programas de control.

En el caso de la lucha frente a la lepra, en la década de los 90 el objetivo

se fijó en conseguir una prevalencia por debajo de 1/10.000 habitantes en el año 2000. Por desgracia, este límite no pudo alcanzarse en numerosas regiones de África, América, el sudeste asiático, el Pacífico Occidental y el Mediterráneo Oriental. De hecho, incluso este objetivo inalcanzado se torna insuficiente si se piensa en regiones de elevada densidad, como la India, en la que se aceptarían niveles de enfermedad por encima de los 100.000 casos, lo cual resulta incompatible con la idea de “eliminar” una enfermedad desde el punto de vista de la Salud Pública. Aunque la prevalencia de la lepra se ha reducido en un 78% en 28 países endémicos en el periodo comprendido entre 1985 y 1996, el incremento en el total de nuevos casos registrados a nivel mundial reportado por la OMS indica una tendencia muy preocupante. Con la excepción de la India, que informó de un descenso de casos entre 1993 y 2005, el número de nuevos casos en otros 16 países en los que se registraron al menos 1000 casos en 2005 se incrementó en un 20%. Dado que la mayor parte de nuevos casos reciben terapias combinadas eficaces en prevenir la diseminación de la bacteria, y por tanto que éstos actúen como fuente de infección para otras personas, el origen de todos estos nuevos casos resulta difícil de identificar, no pudiendo atribuirse en exclusiva a las mejoras en los sistemas de Sanidad y diagnóstico o el incremento de población en riesgo. No obstante, este preocupante panorama no debe impedir observar los avances logrados en la lucha frente a la enfermedad a nivel mundial, como la eliminación de ésta en 119 de los 122 países en los que se había identificado como un problema de Salud Pública en 1985, y la curación de más de 14 millones de personas afectadas en los últimos 20 años. Dado que aún no se han descrito resistencias al tratamiento combinado recomendado por la OMS (dapsona+rifampicina+clofazimina) la intensificación de las actividades de diagnóstico y tratamiento en las zonas endémicas y un mayor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad deberían conducir a la consecución de un mayor control sobre esta plaga de la humanidad.

Esperemos que este panorama que hemos dibujado, lleno de claroscuros, vaya perdiendo sus trazos más grises. Que los esfuerzos combinados de científicos y políticos e incluso de los poderes económicos consigan que podamos cumplir los objetivos que nos hemos marcado y que para la mitad de esta centuria, casi 2 siglos después de haber descubierto su origen infeccioso, estas enfermedades pasen a ser solamente un triste recuerdo en la historia de la humanidad.

He dicho

BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, P., Retamal, P., 2004. [Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?]. *Rev. Sci. Tech.* 23, 583-594.
- Abdala, A., 1998. Tuberculosis bovina. In: Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, I.N.d.T.A. (Ed.), Sancor, pp. 26-30.
- Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., Bitter, W., 2007. Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 883-891.
- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S.H., Hunter, P.R., 2007a. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel. Dis.*
- Abubakar, I., Myhill, D.J., Hart, A.R., Lake, I.R., Harvey, I., Rhodes, J.M., Robinson, R., Lobo, A.J., Probert, C.S., Hunter, P.R., 2007b. A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease—further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Am. J. Epidemiol.* 165, 776-783.
- Aduriz, J.J., Juste, R.A., Cortabarría, N., 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45, 211-217.
- Alexander, K.A., Pleydell, E., Williams, M.C., Lane, E.P., Nyange, J.F., Michel, A.L., 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 598-601.
- Amadori, M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Telo, P., Pacciarini, L., Bonizzi, L., 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 89-96.

- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., 2003a. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., 2003b. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L., 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. J. Clin. Microbiol. 42, 2602-2608.
- Aranaz, A., del Río, R., Ruiz, J., Liebana, E., Montero, N., de Juan, L., Vela, A.I., Mateos, A., Domínguez, L., 2000. Effect of the paratuberculosis vaccine on the IFN-gamma test for tuberculosis in goats.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Domínguez, L., 1999a. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. 49 Pt 3, 1263-1273.
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Dominguez, L., 1999b. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. 49 Pt 3, 1263-1273.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Cousins, D., 1998. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 61, 311-324.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Vidal, D., Domingo, M., González, O., Rodríguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., van Embden, J.D., Cousins, D., 1996a. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 34, 2734-2740.
- Aranaz, A., Liebana, E., Pickering, X., Novoa, C., Mateos, A., Dominguez, L., 1996b. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. Vet. Rec. 138, 276-280.
- Aronson, N.E., Santosham, M., Comstock, G.W., Howard, R.S., Moulton, L.H., Rhoades, E.R., Harrison, L.H., 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. JAMA 291, 2086-2091.

- Aronson, T., Holtzman, A., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Berlin, O.G., Hill, H., Stelma, G., Jr., 1999. Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J Clin. Microbiol.* 37, 1008-1012.
- Arrigoni, N., Cammi, G., Galletti, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., Belletti, G.L., 2007. Bulk milk contamination by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and related risk factors. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Ashford, D.A., Whitney, E., Raghunathan, P., Cosivi, O., 2001a. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 325-337.
- Ashford, D.A., Whitney, E., Raghunathan, P., Cosivi, O., 2001b. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 325-337.
- Athvale, V.B., 1983. Tuberculosis in ayurveda. *Paediatric Clinics of India* 18, 7-9.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Buchler, M.W., Schmidt, J., 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944-949.
- Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1210-1214.
- Aznar, I., McGrath, G., Murphy, D., Corner, L.A., Gormley, E., Frankena, K., More, S.J., Martin, W., O'Keefe, J., de Jong, M.C., 2011. Trial design to estimate the effect of vaccination on tuberculosis incidence in badgers. *Vet Microbiol.* 151, 104-111.
- Baksh, F.K., Finkelstein, S.D., riyanyagam-Baksh, S.M., Swalsky, P.A., Klein, E.C., Dunn, J.C., 2004. Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the microdissected granulomas of Crohn's disease. *Mod. Pathol.* 17, 1289-1294.
- Ballesteros, C., Garrido, J.M., Vicente, J., Romero, B., Galindo, R.C., Minguíjon, E., Villar, M., Martín-Hernando, M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la, F.J., Gortazar, C., 2009a. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine.*
- Ballesteros, C., Gortazar, C., Canales, M., Vicente, J., Lasagna, A., Gamarra, J.A., Carrasco-García, R., Fuente, J.L., 2009b. Evaluation of baits for oral vaccination of European wild boar piglets. *Res. Vet. Sci.* 86, 388-393.

- Balu, S., Reljic, R., Lewis, M.J., Pleass, R.J., McIntosh, R., van, K.C., van, E.M., Challacombe, S., Woof, J.M., Ivanyi, J., 2011. A Novel Human IgA Monoclonal Antibody Protects against Tuberculosis. *J Immunol.*
- Barclay, R., Ewing, D.F., Ratledge, C., 1985. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 164, 896-903.
- Barta, Z., Csipo, I., Mekkel, G., Zeher, M., Majoros, L., 2004. Seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's Disease. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5432-5433.
- Bauer, J., Andersen, A.B., Askgaard, D., Giese, S.B., Larsen, B., 1999. Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2-year period in Denmark by using IS1245. *J. Clin. Microbiol.* 37, 600-605.
- Beggs, M.L., Stevanova, R., Eisenach, K.D., 2000. Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 38, 508-512.
- Behr, M.A., Mostowy, S., 2007. Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Curr. Mol. Med.* 7, 309-317.
- Behr, M.A., Schurr, E., 2006. Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12, 1000-1004.
- Behr, M.A., Semret, M., Poon, A., Schurr, E., 2004. Crohn's disease, mycobacteria, and NOD2. *Lancet Infect. Dis.* 4, 136-137.
- Bergey, G.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., Huntoon, F.M., 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, MD, USA.
- Bernardelli, A., Bastida, R., Loureiro, J., Michelis, H., Romano, M.I., Cataldi, A., Costa, E., 1996. Tuberculosis in sea lions and fur seals from the southwestern Atlantic coast. *Rev. Sci. Tech.* 15, 985-1005.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Rawsthorne, P., Collins, M.T., 2004. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1129-1135.
- Bernstein, C.N., Nayar, G., Hamel, A., Blanchard, J.F., 2003. Study of animal-borne infections in the mucosas of patients with inflammatory bowel disease and population-based controls. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4986-4990.
- Bernstein, C.N., Wang, M.H., Sargent, M., Brant, S.R., Collins, M.T., 2007. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* 45, 968-971.
- Besra, G.S., Sievert, T., Lee, R.E., Slayden, R.A., Brennan, P.J., Takayama, K., 1994. Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12735-12739.

- Black, G.F., Weir, R.E., Floyd, S., Bliss, L., Warndorff, D.K., Crampin, A.C., Ngwira, B., Sichali, L., Nazareth, B., Blackwell, J.M., Branson, K., Chaguluka, S.D., Donovan, L., Jarman, E., King, E., Fine, P.E., Dockrell, H.M., 2002. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 359, 1393-1401.
- Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blöcker, H., Böttger, E.C., 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1751-1759.
- Boniotti, M.B., Goria, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L., 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 47, 636-644.
- Bono, M., Jemmi, T., Bernasconi, C., Burki, D., Telenti, A., Bodmer, T., 1995. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 371-373.
- Borody, T.J., Bilkey, S., Wettstein, A.R., Leis, S., Pang, G., Tye, S., 2007. Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. *Dig. Liver Dis.* 39, 438-444.
- Borody, T.J., Leis, S., Warren, E.F., Surace, R., 2002. Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy—approaching a cure? *Dig. Liver Dis.* 34, 29-38.
- Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T., 2006. Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69, 1662-1667.
- Brandt, L., Feino, C.J., Weinreich, O.A., Chilima, B., Hirsch, P., Appelberg, R., Andersen, P., 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 672-678.
- Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63.
- Brodin, P., de Jonge, M.I., Majlessi, L., Leclerc, C., Nilges, M., Cole, S.T., Brosch, R., 2005. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. *J Biol. Chem.* 280, 33953-33959.

- Brosch, R., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Cole, S.T., 2000. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. *Res. Microbiol.* 151, 135-142.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos, S.S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M.A., Quail, M.A., Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Cole, S.T., 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 5596-5601.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutiérrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 3684-3689.
- Brothwell, D., Sandison, A.T., 1967. *Diseases of antiquity*. Springfield, IL (EEUU).
- Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J., Jr., 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 716-746.
- Browne, S.G., 1977. Leprosy in Britain. *Nurs. Times* 73, 1667-1669.
- Buddle, B.M., Denis, M., Aldwell, F.E., Martin, V.H., Glyn, H.R., Neil, W.D., 2008. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes. *Tuberculosis. (Edinb.)* 88, 595-600.
- Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Vet Microbiol.*
- Buergelt, C.D., Green, S.L., Mayhew, I.G., Wilson, J.H., Merritt, A.M., 1988. Avian mycobacteriosis in three horses. *Cornell Vet.* 78, 365-380.
- Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J., 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2915-2923.
- Bull, T.J., Sheridan, J.M., Martin, H., Sumar, N., Tizard, M., Hermon-Taylor, J., 2000. Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (*mpa*) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77, 453-463.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., Van, S.D., 2009a. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2066-2067.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van, S.D., 2009b.

- Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2066-2067.
- Cai, H., Yu, D.H., Hu, X.D., Li, S.X., Zhu, Y.X., 2006. A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against *Mycobacterium bovis* challenge. *DNA Cell Biol.* 25, 438-447.
- Cardona, P.J., Amat, I., 2006. [Origin and development of RUTI, a new therapeutic vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection]. *Arch. Bronconeumol.* 42, 25-32.
- Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., De, J.L., Alvarez, J., Bezos, J., Rodriguez, S., Stevenson, K., Mateos, A., Dominguez, L., 2007. Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3439-3442.
- Castets, M., Rist, N., Boisvert, H., 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine d'Afrique Noire* 4, 321-322.
- Castets, M., Sarrat, H., 1969. Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note). *Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lang Fr.* 14, 693-696.
- Cerf, O., Griffiths, M., Aziza, F., 2007. Assessment of the Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. *Foodborne. Pathog. Dis.* 4, 433-447.
- Checkley, A.M., McShane, H., 2011. Tuberculosis vaccines: progress and challenges. *Trends Pharmacol. Sci.*
- Chen, L., Jondal, M., 2009. TLR9 activation increases TAP-independent vesicular MHC class I processing in vivo. *Scand. J Immunol.* 70, 431-438.
- Chiodini, R.J., 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 90-117.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer, W.R., Jr., Coutu, J.A., 1984. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20, 966-971.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Coutu, J.A., 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 24, 357-363.
- Cho, H.S., Kim, Y.H., Park, N.Y., 2006. Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium avium* in captive Bengal tiger (*Panthera tigris*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 312-314.
- Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., Paolicchi, F., 2007. [*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food and its relationship with Crohn's disease]. *Rev. Argent Microbiol.* 39, 57-68.
- Clancy, R., Ren, Z., Turton, J., Pang, G., Wettstein, A., 2007. Molecular evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in

- Crohn's disease correlates with enhanced TNF-alpha secretion. *Dig. Liver Dis.* 39, 445-451.
- Clark, D.L., Jr., Anderson, J.L., Koziczowski, J.J., Ellingson, J.L., 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell Probes* 20, 197-202.
- Clercx, C., Coignoul, F., Jakovljevic, S., Balligand, M., Mainil, J., Henroteaux, M., Kaeckenbeeck, A., 1992. Tuberculosis in dogs: a case report and review of the literature. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 28, 207-211.
- Cline, J.M., Schlafer, D.W., Callihan, D.R., Vanderwall, D., Drazek, F.J., 1991. Abortion and granulomatous colitis due to *Mycobacterium avium* complex infection in a horse. *Vet. Pathol.* 28, 89-91.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de, K.M., Poupart, P., Vannuffel, P., 1994. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-345.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., III, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G., ., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., Barrell, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007-1011.
- Coleman, J.D., Cooke, M.M., 2001. *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. *Tuberculosis. (Edinb.)* 81, 191-202.
- Collins, C.H., Yates, M.D., Grange, J.M., 1982a. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J. Hyg. (Lond)* 89, 235-242.
- Collins, C.H., Yates, M.D., Grange, J.M., 1982b. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J. Hyg. (Lond)* 89, 235-242.
- Collins, D.M., 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis. (Edinb.)* 81, 97-102.
- Collins, D.M., De Zoete, M., Cavaignac, S.M., 2002. *Mycobacterium avium*

- subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4760-4762.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596.
- Collins, M.T., 1997. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *J. Dairy Sci.* 80, 3445-3448.
- Collins, M.T., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D., Christensen, S., Reichelderfer, M., Hoiby, N., Harms, B.A., Thomsen, O.O., Skibsted, U., Binder, V., 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4373-4381.
- Collins, M.T., Shin, S.J., 2007. Thipurine drugs (azathioprine and 6-mercaptopurine) inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth *in vitro*. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Collins, P., McDiarmid, A., Thomas, L.H., Matthews, P.R., 1985. Comparison of the pathogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium* spp isolated from the wood pigeon (*Columba palumbus*-L). *J. Comp Pathol.* 95, 591-597.
- Comstock, G.W., Palmer, C.E., 1966. Long-term results of BCG vaccination in the southern United States. *Am Rev. Respir. Dis.* 93, 171-183.
- Corner, L.A., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 112, 303-312.
- Corpa, J.M., Perez, V., Sanchez, M.A., Marin, J.F., 2000. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet. Rec.* 146, 195-196.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de, K., I, Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59-70.
- Cousins, D.V., 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech.* 20, 71-85.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumárraga, M., Bernardelli, A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1305-1314.

- Cousins, D.V., Peet, R.L., Gaynor, W.T., Williams, S.N., Gow, B.L., 1994. Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 42, 135-145.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184-190.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P., Gales, N., 1993. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Aust. Vet. J.* 70, 92-97.
- Covert, T.C., Rodgers, M.R., Reyes, A.L., Stelma, G.N., Jr., 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2492-2496.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., Jacobs, W.R., Jr., 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79-83.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de, I.R.-D., 2008a. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.* 163, 127.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de, I.R.-D., 2008b. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.* 163, 127.
- Crohn, B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G., 1932. Regional ileitis, a pathological and clinical entity. *J. Am. Med. Assoc.* 99, 1323-1329.
- Cuttino, J.T., McCABE, A.M., 1949. Pure granulomatous nocardiosis, a new fungus disease distinguished by intracellular parasitism; a description of a new disease in man due to a hitherto undescribed organism, *Nocardia intracellularis*, n. sp., including a study of the biologic and pathogenic properties of this species. *Am. J. Pathol.* 25, 1-47.
- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B.K., Vickovic, I., 2007a. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11, 652-658.
- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B.K., Vickovic, I., 2007b. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11, 652-658.
- Daffé, M., Etienne, G., 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung Dis.* 79, 153-169.
- Dalziel, T.K., 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br. Med. J.* 2, 1068-1070.
- Daniel, R., Evans, H., Rolfe, S., Rua-Domenech, R., Crawshaw, T., Higgins,

- R.J., Schock, A., Clifton-Hadley, R., 2009. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. *Vet. Rec.* 165, 335-342.
- Dankner, W.M., Waecker, N.J., Essey, M.A., Moser, K., Thompson, M., Davis, C.E., 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 72, 11-37.
- de Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodriguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102-110.
- de Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249-257.
- De Kantor, I.N., Ritacco, V., 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol.* 112, 111-118.
- de Kantor, I.N., Ritacco, V., 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112, 111-118.
- de Lisle, G.W., Yates, G.F., Joyce, M.A., Cavaignac, S.M., Hynes, T.J., Collins, D.M., 1998. Case report and DNA characterization of *Mycobacterium avium* isolates from multiple animals with lesions in a beef cattle herd. *J. Vet. Diagn. Invest* 10, 283-284.
- di Guardo G., de, A.G., Longo, P.L., 1991. Atypical *M avium* induced tubercular lesions in pigs. *Vet. Rec.* 129, 476.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T.J., Gerlach, G.F., 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5215-5223.
- Donaghy, J.A., Linton, M., Patterson, M.F., Rowe, M.T., 2007. Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 154-159.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L., Rowe, M.T., 2003. Iodixanol development of a laboratory-scale technique to monitor the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Cheddar cheese. *ScientificWorldJournal.* 3, 1241-1248.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L., Rowe, M.T., 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4899-4905.

- dos Santos, N.M., do, V.A., Sousa, M.J., Silva, M.T., 2002. Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Organ* 52, 87-91.
- Dow, C.T., 2006. Paratuberculosis and Type I diabetes: is this the trigger? *Med. Hypotheses* 67, 782-785.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.* 130, 415-421.
- DUBOS, R.J., HIRSCH, J.G., 1954. The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus. *J Exp. Med* 99, 55-63.
- Dunn, J.R., Kaneene, J.B., Grooms, D.L., Bolin, S.R., Bolin, C.A., Bruning-Fann, C.S., 2005. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 429-435.
- Dvorska, L., Bartos, M., Ostadal, O., Kaustova, J., Matlova, L., Pavlik, I., 2002. IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin. Microbiol.* 40, 3712-3719.
- Dvorska, L., Matlova, L., Ayele, W.Y., Fischer, O.A., Amemori, T., Weston, R.T., Alvarez, J., Beran, V., Moravkova, M., Pavlik, I., 2007. Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeideae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Vet. Microbiol.* 119, 366-374.
- Dvorska, L., Matlova, L., Bartos, M., Parmova, I., Bartl, J., Svastova, P., Bull, T.J., Pavlik, I., 2004. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet. Microbiol.* 99, 239-250.
- el Zaatari, F.A., Naser, S.A., Markesich, D.C., Kalter, D.C., Engstand, L., Graham, D.Y., 1996. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2240-2245.
- Ellingson, J.L., Anderson, J.L., Koziczkowski, J.J., Radcliff, R.P., Sloan, S.J., Allen, S.E., Sullivan, N.M., 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* 68, 966-972.
- Ellingson, J.L., Cheville, J.C., Brees, D., Miller, J.M., Cheville, N.F., 2003. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin. Med. Res.* 1, 217-226.
- Ellis, M.D., Davies, S., McCandlish, I.A., Monies, R., Jahans, K., Rua-

- Domenech, R., 2006. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *Vet. Rec.* 159, 46-48.
- Emery, D.L., Whittington, R.J., 2004. An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 104, 143-155.
- Emmanuel, F.X., Seagar, A.L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I., 2007. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1924-1927.
- Encinales, L., Zuniga, J., Granados-Montiel, J., Yunis, M., Granados, J., Almeciga, I., Clavijo, O., Awad, C., Collazos, V., Vargas-Rojas, M.I., Banales-Mendez, J.L., Vazquez-Castaneda, L., Stern, J.N., Romero, V., Frindkis-Hareli, M., Terreros, D., Fernandez-Vina, M., Yunis, E.J., 2009. Humoral immunity in tuberculin skin test anergy and its role in high-risk persons exposed to active tuberculosis. *Mol. Immunol.*
- Eppleston, J., Windsor, P.A., 2007. Lesions attributed to vaccination of sheep with Gudair for the control of ovine paratuberculosis: post farm economic impacts at slaughter. *Aust. Vet. J.* 85, 129-133.
- Erler, W., Martin, G., Sachse, K., Naumann, L., Kahlau, D., Beer, J., Bartos, M., Nagy, G., Cvetnic, Z., Zolnir-Dovc, M., Pavlik, I., 2004. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2234-2238.
- Erwin, P.C., Bemis, D.A., McCombs, S.B., Sheeler, L.L., Himelright, I.M., Halford, S.K., Diem, L., Metchock, B., Jones, T.F., Schilling, M.G., Thomsen, B.V., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2258-10.
- Fairchild, A.L., Oppenheimer, G.M., 1998. Public health nihilism vs pragmatism: history, politics, and the control of tuberculosis. *Am J Public Health* 88, 1105-1117.
- Falkinham, J.O., III, 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215.
- Falkinham, J.O., III, 2003a. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5685-5689.
- Falkinham, J.O., III, 2003b. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can. J. Infect. Dis.* 14, 281-286.
- Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Cousins, D.V., Dawson, D., Chew, W., Gilbert, G.L., Hampson, D.J., 1996. Genetic characterization of *Mycobacterium avium* isolates recovered from humans and animals in Australia. *Epidemiol. Infect.* 116, 41-49.
- Feldman, W.H., Davies, R., Moses, H.E., Andberg, W., 1943. An unusual mycobacterium isolate from a sputum of a man suffering from pulmonary disease of long duration. *Am. Rev. Tuberc.* 48, 272-290.

- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., Egger, M., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 607-613.
- Fetene, T., Kebede, N., Alem, G., 2009. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Ethiopia. *Zoonoses. Public Health.*
- Field, S.K., Fisher, D., Cowie, R.L., 2004. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* 126, 566-581.
- Fischer, O., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Melicharek, I., Pavlik, I., 2000. Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol. (Praha)* 45, 147-152.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du, M.R., Melicharek, I., Bartos, M., Pavlik, I., 2003. Earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet. Microbiol.* 91, 325-338.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Peral, D.L., Weston, R.T., Bartos, M., Pavlik, I., 2004. Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet. Microbiol.* 102, 247-255.
- Fleischman, R.W., du Moulin, G.C., Esber, H.J., Ilievski, V., Bogden, A.E., 1982. Nontuberculous mycobacterial infection attributable to *Mycobacterium intracellulare* serotype 10 in two rhesus monkeys. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1358-1362.
- Forshaw, D., Phelps, G.R., 1991. Tuberculosis in a captive colony of pin-nipeds. *J. Wildl. Dis.* 27, 288-295.
- Francis, J., 1958. Tuberculosis in animals and a man. London: Cassell.
- Francis, J., MACTURK, H.M., MADINAVEITIA, J., SNOW, G.A., 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* 55, 596-607.
- Frota, C.C., Hunt, D.M., Buxton, R.S., Rickman, L., Hinds, J., Kremer, K., Van, S.D., Colston, M.J., 2004. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology* 150, 1519-1527.
- Frothingham, R., Wilson, K.H., 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 175, 2818-2825.
- Frothingham, R., Wilson, K.H., 1994. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J. Infect. Dis.* 169, 305-312.
- Fujita, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T., Koike, M., 2002. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* 37, 509-516.

- Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S., 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69, 203-217.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J., 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci.* 85, 3198-3205.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7877-7882.
- Garrido, J.M., Molina, E., Geijo, M.V., Plazaola, J.M., Sevilla, I., Juste, R.A., 2007. Preliminary evaluation of a field trial on the use of vaccination in dairy cattle farms with paratuberculosis. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S.B., Irvine, E.J., Jewell, D.P., Rachmilewitz, D., Sachar, D.B., Sandborn, W.J., Sutherland, L.R., 2000. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm. Bowel. Dis.* 6, 8-15.
- Gercken, J., Pryjma, J., Ernst, M., Flad, H.D., 1994. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* 62, 3472-3478.
- Giese, S.B., Ahrens, P., 2000. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 77, 291-297.
- Gill, I.J., Blandy, M.L., 1986. Control of avian tuberculosis in a commercial poultry flock. *Aust. Vet. J.* 63, 422-423.
- Gillis, T., 2007. Is there a role for a vaccine in leprosy control? *Lepr. Rev.* 78, 338-342.
- Girardin, S.E., Hugot, J.P., Sansonetti, P.J., 2003. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* 24, 652-658.
- Gordon, A.H., Hart, P.D., Young, M.R., 1980. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79-80.
- Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T., 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643-655.
- Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Gavin, P., Juste, R.A., Martín, C., Acevedo, P., de la Puente M., Hofle, U., 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet. Res.* 36, 43-52.

- Grange, J.M., 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis. (Edinb.) 81, 71-77.
- Grange, J.M., Gibson, J., Osborn, T.W., Collins, C.H., Yates, M.D., 1983. What is BCG? Tubercle. 64, 129-139.
- Grange, J.M., Yates, M.D., 1989. Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-87. Epidemiol. Infect. 103, 127-132.
- Grant, I.R., 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. J. Appl. Microbiol. 98, 1282-1293.
- Grant, I.R., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2002a. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2428-2435.
- Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T., 2002b. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. Appl. Environ. Microbiol. 68, 602-607.
- Grant, I.R., O'Riordan, L.M., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2001. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. Vet. Microbiol. 79, 123-131.
- Grant, I.R., Williams, A.G., Rowe, M.T., Muir, D.D., 2005. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2853-2861.
- Greenstein, R.J., 2003. Is Crohn's disease caused by a *mycobacterium*? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. Lancet Infect. Dis. 3, 507-514.
- Greenstein, R.J., Su, L., Brown, S.T., 2007. *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) the cause of multiple "autoimmune" and "inflammatory" diseases in man? Inferences from the antiMAP activity of methotrexate, 6-MP, 5-ASA and thalidomide on MAP culture. Proc. 9th. Int. Coll. Paratub. 9.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E., McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. J. Clin. Microbiol. 37, 1746-1751.
- Greth, A., Flamand, J.R., Delhomme, A., 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): management. Vet. Rec. 134, 165-167.
- Guerardel, Y., Maes, E., Ellass, E., Leroy, Y., Timmerman, P., Besra, G.S., Loch, C., Strecker, G., Kremer, L., 2002. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of

- unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. *J. Biol. Chem.* 277, 30635-30648.
- Guerrero, A., Cobo, J., Fortún, J., Navas, E., Quereda, C., Asensio, A., Cañón, J., Blázquez, J., Gómez-Mampaso, E., 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 350, 1738-1742.
- Gunn-Moore, D.A., Jenkins, P.A., Lucke, V.M., 1996. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec.* 138, 53-58.
- Gunnes, G., Nord, K., Vatn, S., Saxegaard, F., 1995. A case of generalised avian tuberculosis in a horse. *Vet. Rec.* 136, 565-566.
- Gupta, K.N.N.S., 1909. *The Ayurvedic System of Medicine*. Chatterjee Press, Calcutta.
- Guthertz, L.S., Damsker, B., Bottone, E.J., Ford, E.G., Midura, T.F., Janda, J.M., 1989. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J. Infect. Dis.* 160, 1037-1041.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M.S., van Embden, J.D., Marín, J.F., Martín, C., 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3328-3330.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., Murray, A., West, D.M., 2000. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560-566.
- Haas, W.H., Bretzel, G., Amthor, B., Schilke, K., Krommes, G., Rusch-Gerdes, S., Sticht-Groh, V., Bremer, H.J., 1997a. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. *J. Clin. Microbiol.* 35, 663-666.
- Haas, W.H., Schilke, K., Brand, J., Amthor, B., Weyer, K., Fourie, P.B., Bretzel, G., Sticht-Groh, V., Bremer, H.J., 1997b. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1601-1603.
- Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 489-512.
- Hart, P.D., Sutherland, I., 1977a. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br. Med. J.* 2, 293-295.
- Hart, P.D., Sutherland, I., 1977b. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br. Med. J.* 2, 293-295.

- Hejlíček, K., Tremel, F., 1995. [Comparison of the pathogenesis and epizootiologic importance of avian mycobacteriosis in various types of domestic and free-living syntropic birds]. *Vet. Med. (Praha)* 40, 187-194.
- Helie, P., Higgins, R., 1996. *Mycobacterium avium* complex abortion in a mare. *J. Vet. Diagn. Invest* 8, 257-258.
- Hermon-Taylor, J., 2001. Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 49, 755-756.
- Hermon-Taylor, J., 2002. Treatment with drugs active against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* can heal Crohn's disease: more evidence for a neglected public health tragedy. *Dig. Liver Dis.* 34, 9-12.
- Hermon-Taylor, J., Bull, T., 2002. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J. Med. Microbiol.* 51, 3-6.
- Hermon-Taylor, J., Bull, T.J., Sheridan, J.M., Cheng, J., Stellakis, M.L., Sumar, N., 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can. J. Gastroenterol.* 14, 521-539.
- Hewes, C.A., Schneider, R.K., Baszler, T.V., Oaks, J.L., 2005. Septic arthritis and granulomatous synovitis caused by infection with *Mycobacterium avium* complex in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 2035-8, 2002.
- Holland, S.M., Dorman, S.E., Kwon, A., Pitha-Rowe, I.F., Frucht, D.M., Gerstberger, S.M., Noel, G.J., Vesterhus, P., Brown, M.R., Fleisher, T.A., 1998. Abnormal regulation of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor-alpha in human interferon-gamma receptor 1 deficiency. *J Infect. Dis.* 178, 1095-1104.
- Hoop, R.K., Bottger, E.C., Pfyffer, G.E., 1996. Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *J. Clin. Microbiol.* 34, 991-992.
- Hope, J.C., Thom, M.L., McCormick, P.A., Howard, C.J., 2004. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100, 187-195.
- Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Howard, C.J., 2005. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 432-439.
- Horn, B., Forshaw, D., Cousins, D., Irwin, P.J., 2000. Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a dog with chronic diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 78, 320-325.
- Horsburgh, C.R., Jr., 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 324, 1332-1338.
- Horsburgh, C.R., Jr., Gettings, J., Alexander, L.N., Lennox, J.L., 2001. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients

- infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. Clin. Infect. Dis. 33, 1938-1943.
- Huard, R.C., Fabre, M., de, H.P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D., Ho, J.L., 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Bacteriol. 188, 4271-4287.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411, 599-603.
- Huitema, H., Jaartsveld, F.H., 1967. *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. Antonie Van Leeuwenhoek 33, 209-212.
- Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Karttunen, T.J., Almarshrawi, A., Schwartz, M.R., Graham, D.Y., el-Zaatari, F.A., 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. Am. J. Gastroenterol. 96, 1529-1535.
- Hunter, P.R., 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J. Clin. Microbiol. 28, 1903-1905.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W.Y., Roubal, P., Lukas, J., Cook, N., Gazouli, M., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8934-8936.
- Inderlied, C.B., Kemper, C.A., Bermudez, L.E., 1993. The *Mycobacterium avium* complex. Clin. Microbiol. Rev. 6, 266-310.
- Jaravata, C.V., Smith, W.L., Rensen, G.J., Ruzante, J., Cullor, J.S., 2007. Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Foodborne. Pathog. Dis. 4, 103-106.
- Jeevan, A., Sharma, A.K., McMurray, D.N., 2009. Ultraviolet radiation reduces resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection in BCG-vaccinated guinea pigs. Tuberculosis. (Edinb.) 89, 431-438.
- Johansen, T.B., Djonne, B., Jensen, M.R., Olsen, I., 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. J. Clin. Microbiol. 43, 2500-2502.
- Johansen, T.B., Olsen, I., Jensen, M.R., Dahle, U.R., Holstad, G., Djonne, B., 2007. New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. BMC. Microbiol. 7, 14.
- Johne, H.A., Frothingham, L., 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. Deut. Zeits. Tiermed. Vergl. Pathol. 21, 438-454.

- Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A., 2006a. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. Tuberculosis. (Edinb.).
- Johnson, L., Gough, J., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A., 2006b. Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. Vet Immunol. Immunopathol. 111, 219-229.
- Jones, D., Metzger, H.J., Schatz, A., Waksman, S.A., 1944. CONTROL OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN EXPERIMENTAL ANIMALS BY STREPTOMYCIN. Science 100, 103-105.
- Jorgensen, J.B., Clausen, B., 1976. Mycobacteriosis in a roe-deer caused by wood-pigeon mycobacteria. Nord. Vet. Med. 28, 539-546.
- Juan, C., Fernández, J., Domingo, M., Aduriz, G., 1996. Tuberculosis aviar en aves no domésticas. Med. Vet. 13, 135-151.
- Juffermans, N.P., Verbon, A., van Deventer, S.J., van, D.H., Speelman, P., van der Poll, T., 1998. Tumor necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. Am J Respir. Crit Care Med 157, 1328-1331.
- Kalis, C.H., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., 2001. Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. Am. J. Vet. Res. 62, 270-274.
- Karakousis, P.C., Bishai, W.R., Dorman, S.E., 2004a. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. Cell Microbiol. 6, 105-116.
- Karakousis, P.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., 2004b. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active anti-retroviral therapy. Lancet Infect. Dis. 4, 557-565.
- Karlson, A.G., Lessel, E.F., 1970. *Mycobacterium bovis* nom.nov. Int J. Syst. Bacteriol. 20, 273-282.
- Kaufmann, S.H., 2011. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. Lancet Infect. Dis. 11, 633-640.
- Keller, A.P., Beggs, M.L., Amthor, B., Bruns, F., Meissner, P., Haas, W.H., 2002. Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. J. Clin. Microbiol. 40, 1869-1872.
- Kennedy, D.J., Benedictus, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev. Sci. Tech. 20, 151-179.

- Khare, S., Hondalus, M.K., Nunes, J., Bloom, B.R., Garry, A.L., 2007. *Mycobacterium bovis* DeltaleuD auxotroph-induced protective immunity against tissue colonization, burden and distribution in cattle intranasally challenged with *Mycobacterium bovis* Ravenel S. *Vaccine* 25, 1743-1755.
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., van Soolingen, D., Koeter, G., 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1469-1473.
- Koch, R., 1882. Die aetiologie der tuberculose. *Berliner klinische Wochenschrift* 19, 221-230.
- Kohler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Drager, K.G., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cubler, K., Klawonn, W., Hess, R.G., 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 185-195.
- Komijn, R.E., de Haas, P.E., Schneider, M.M., Eger, T., Nieuwenhuijs, J.H., van den Hoek, R.J., Bakker, D., Zijl Erveld, F.G., van Soolingen, D., 1999. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1254-1259.
- Korbel, D.S., Schneider, B., Schaible, U.E., 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes. Infect.*
- Kormendy, B., 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol.* 41, 117-125.
- Kremer, K., van Soolingen, D., van Embden, J., Hughes, S., Inwald, J., Hewinson, G., 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2793-2794.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S., 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3070-3077.
- Kumar, S., Bose, M., Isa, M., 2006. Genotype analysis of human *Mycobacterium avium* isolates from India. *Indian J Med. Res.* 123, 139-144.
- Kunze, Z.M., Portaels, F., McFadden, J.J., 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2366-2372.
- Kunze, Z.M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M.T., Portaels, F., McFadden, J.J., 1991. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 5, 2265-2272.

- Lari, N., Rindi, L., Bonanni, D., Tortoli, E., Garzelli, C., 2006. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4218-4221.
- Lari, N., Rindi, L., Cristofani, R., Rastogi, N., Tortoli, E., Garzelli, C., 2009. Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 538-543.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I.L., Poli, G., Bonizzi, L., 2000. Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet. J.* 160, 17-24.
- Le Dantec C., Duguet, J.P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V., 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5318-5325.
- Legrand, E., Sola, C., Verdol, B., Rastogi, N., 2000. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* recovered from AIDS patients in the caribbean as studied by a consensus IS1245-RFLP method and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 151, 271-283.
- Leifsson, P.S., Olsen, S.N., Larsen, S., 1997. Ocular tuberculosis in a horse. *Vet. Rec.* 141, 651-654.
- Levy-Frebault, V.V., Thorel, M.F., Varnerot, A., Gicquel, B., 1989. DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, "wood pigeon mycobacteria," and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2823-2826.
- Lewinsohn, D.M., Alderson, M.R., Briden, A.L., Riddell, S.R., Reed, S.G., Grabstein, K.H., 1998. Characterization of human CD8+ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen-presenting cells. *J Exp. Med* 187, 1633-1640.
- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V., 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 12344-12349.
- Liébana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., Dominguez, L., 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 33-36.
- Lillini, E., De Grossi, L., Bitonti, G., Cersini, A., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in commercially pasteurized cow's milk in Italy. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Loftus, E.V., Jr., Sandborn, W.J., 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 1-20.
- Lomme, J.R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W., King, R.E., 1976.

- Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 912-914.
- Lopez-Valencia, G., Renteria-Evangelista, T., Williams, J.J., Licea-Navarro, A., Mora-Valle, A.L., Medina-Basulto, G., 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci. 88, 44-49.
- Lund, B.M., Gould, G.W., Rampling, A.M., 2002. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. Int. J. Food Microbiol. 77, 135-145.
- Lutze-Wallace, C., Turcotte, C., Glover, G., Cousins, D., Bell, J., Berlie-Surujballi, G., Barbeau, Y., Randall, G., 2006. Isolation of a *Mycobacterium microti*-like organism from a rock hyrax (*Procavia capensis*) in a Canadian zoo. Can. Vet. J. 47, 1011-1013.
- Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik, I., 2003. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 and 2001. Vet. Med. (Praha) 48, 51-65.
- Maglione, P.J., Chan, J., 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. J. Immunol. 39, 676-686.
- Malone, F.E., Wilson, E.C., Pollock, J.M., Skuce, R.A., 2003. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 50, 500-504.
- Manabe, Y.C., Scott, C.P., Bishai, W.R., 2002. Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 70, 1566-1570.
- Marks, J., Jenkins, P.A., Schaefer, W.B., 1969. Identification and incidence of a third type of *Mycobacterium avium*. Tubercle. 50, 394-395.
- Marsh, I.B., Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Tizard, M.L., Kapur, V., Whittington, R.J., 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. J. Bacteriol. 188, 2290-2293.
- Marsh, I.B., Whittington, R.J., 2005. Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. Mol. Cell Probes 19, 371-384.
- Marsh, I.B., Whittington, R.J., 2007. Genomic diversity in *Mycobacterium avium*: Single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and with *M. a. avium*. Mol. Cell. Probes 21, 66-75.

- Martin, M.C., Gicquel, B., 2011. New tuberculosis vaccines. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29 Suppl 1, 57-62.
- Martins, A.B., Matos, E.D., Lemos, A.C., 2005. Infection with the *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions: a case report and literature review. *Braz. J. Infect. Dis.* 9, 173-179.
- Matlova, L., Dvorska, L., Ayele, W.Y., Bartos, M., Amemori, T., Pavlik, I., 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1261-1268.
- Matlova, L., Dvorska, L., Palecek, K., Maurenc, L., Bartos, M., Pavlik, I., 2004. Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment. *Vet. Microbiol.* 102, 227-236.
- Matthews, P.R., McDiarmid, A., Collins, P., Brown, A., 1978. The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. *J. Med. Microbiol.* 11, 53-57.
- Maue, A.C., Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Minion, F.C., Brown, W.C., Norimine, J., Foote, M.R., Scherer, C.F., Estes, D.M., 2007. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* 25, 4735-4746.
- Mazzaccaro, R.J., Gedde, M., Jensen, E.R., van Santen, H.M., Ploegh, H.L., Rock, K.L., Bloom, B.R., 1996. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11786-11791.
- McDonald, W.L., O'Riley, K.J., Schroen, C.J., Condrón, R.J., 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1785-1789.
- McFadden, J.J., Butcher, P.D., Chiodini, R., Hermon-Taylor, J., 1987. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 796-801.
- Meissner, G., Schroder, K.H., Amadio, G.E., Anz, W., Chaparas, S., Engel, H.W., Jenkins, P.A., Kappler, W., Kleeberg, H.H., Kubala, E., Kubin, M., Lauterbach, D., Lind, A., Magnusson, M., Mikova, Z., Pattyn, S.R., Schaefer, W.B., Stanford, J.L., Tsukamura, M., Wayne, L.G., Willers, I., Wolinsky, E., 1974. A co-operative numerical analysis of non-scoto- and non-photochromogenic slowly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 83, 207-235.
- Mendez, D., Gimenez, F., Escalona, A., Da, M.O., Gonzalez, A., Takiff, H., de

- Waard, J.H., 2006. *Mycobacterium bovis* cultured from commercially pasteurized cows' milk: laboratory cross-contamination. *Vet. Microbiol.* 116, 325-328.
- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J.* 160, 92-106.
- Merkal, R.S., Curran, B.J., 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28, 276-279.
- Merkal, R.S., McCulloch, W.G., 1882. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 7, 333-335.
- Merle, C.S., Cunha, S.S., Rodrigues, L.C., 2010. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert. Rev. Vaccines.* 9, 209-222.
- Michel, A.L., Muller, B., van Helden, P.D., 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140, 371-381.
- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., Van der, L.T., Rigouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D., 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1505-1518.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J., 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3446-3452.
- Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G., Besra, G.S., 2002. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 9, 545-553.
- Mobius, P., Lentzsch, P., Moser, I., Naumann, L., Martin, G., Kohler, H., 2006. Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet. Microbiol.*
- Mohamed, A.M., bou El-Ella, G.A., Nasr, E.A., 2009. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *J. Vet. Diagn. Invest* 21, 48-52.
- Molloy, A., Meyn, P.A., Smith, K.D., Kaplan, G., 1993. Recognition and destruction of Bacillus Calmette-Guerin-infected human monocytes. *J Exp. Med* 177, 1691-1698.
- Monies, B., Jahans, K., de la Rúa, R., 2006. Bovine tuberculosis in cats. *Vet. Rec.* 158, 280.
- Monreal, L., Segura, D., Segales, J., Garrido, J.M., Prades, M., 2001. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a mare. *Vet. Rec.* 149, 712-714.

- Montali, R.J., Mikota, S.K., Cheng, L.I., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. Rev. Sci. Tech. 20, 291-303.
- Moore, T.D., Allen, A.M., Ganaway, J.R., Sevy, C.E., 1971. A fatal infection in the opossum due to *Mycobacterium intracellulare*. J. Infect. Dis. 123, 569-578.
- Morita, Y., Arai, M., Nomura, O., Maruyama, S., Katsube, Y., 1994. Avian tuberculosis which occurred in an imported pigeon and pathogenicity of the isolates. J. Vet. Med. Sci. 56, 585-587.
- MORSE, D., Brothwell, D.R., Ucko, P.J., 1964. TUBERCULOSIS IN ANCIENT EGYPT. Am. Rev. Respir. Dis. 90, 524-541.
- Moss, M.T., Malik, Z.P., Tizard, M.L., Green, E.P., Sanderson, J.D., Hermon-Taylor, J., 1992. IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. J. Gen. Microbiol. 138 (Pt 1), 139-145.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A., Behr, M.A., 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Infect. Dis. 186, 74-80.
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D., Behr, M.A., 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J. Bacteriol. 187, 6386-6395.
- Mura, M., Bull, T.J., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J., 2006. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. Appl. Environ. Microbiol. 72, 854-859.
- Murcia, M.I., Tortoli, E., Menendez, M.C., Palenque, E., Garcia, M.J., 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2049-2054.
- Murray, C.J., Salomon, J.A., 1998a. Expanding the WHO tuberculosis control strategy: rethinking the role of active case-finding. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2, S9-15.
- Murray, C.J., Salomon, J.A., 1998b. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 13881-13886.
- Muskens, J., van Zijderveld, F., Eger, A., Bakker, D., 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. Vet. Microbiol. 86, 269-278.
- Nakase, H., Nishio, A., Tamaki, H., Matsuura, M., Asada, M., Chiba, T., Okazaki, K., 2006. Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. Inflamm. Bowel. Dis. 12, 62-69.

- Naser, S., Shafran, I., El-Zaatari, F., 1999. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's disease is serologically positive. Clin. Diagn. Lab Immunol. 6, 282.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet 364, 1039-1044.
- Naser, S.A., Hulten, K., Shafran, I., Graham, D.Y., el-Zaatari, F.A., 2000a. Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 77, 497-504.
- Naser, S.A., Schwartz, D., Shafran, I., 2000b. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. Am. J. Gastroenterol. 95, 1094-1095.
- Naughton, J.F., Mealey, K.L., Wardrop, K.J., Oaks, J.L., Bradway, D.S., 2005. Systemic *Mycobacterium avium* infection in a dog diagnosed by polymerase chain reaction analysis of buffy coat. J. Am. Anim Hosp. Assoc. 41, 128-132.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J., Hanna, J., 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Vet Microbiol. 28, 103-109.
- Nel, E.E., 1981. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovars isolated in South Africa from humans, swine, and the environment. Rev. Infect. Dis. 3, 1013-1020.
- Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R., Talts, J.F., Salzer, J.L., Brennan, P.J., Rambukkana, A., 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell 103, 511-524.
- Niemann, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., 2002a. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 433-436.
- Niemann, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., 2002b. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 433-436.
- Nightingale, S.D., Byrd, L.T., Southern, P.M., Jockusch, J.D., Cal, S.X., Wynne, B.A., 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. J. Infect. Dis. 165, 1082-1085.
- Ninet, B., Monod, M., Emler, S., Pawlowski, J., Metral, C., Rohner, P.,

- Auckenthaler, R., Hirschel, B., 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2531-2536.
- Nirmala, R., Narayanan, P.R., Mathew, R., Maran, M., Deivanayagam, C.N., 2001. Reduced NK activity in pulmonary tuberculosis patients with/without HIV infection: identifying the defective stage and studying the effect of interleukins on NK activity. *Tuberculosis. (Edinb.)* 81, 343-352.
- Novi, C., Rindi, L., Lari, N., Garzelli, C., 2000. Molecular typing of *Mycobacterium avium* isolates by sequencing of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer and comparison with IS1245-based fingerprinting. *J. Med. Microbiol.* 49, 1091-1095.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B., 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Prev. Vet. Med.* 54, 47-63.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I.R., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P., 2004. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5138-5144.
- O'Toole, D., Tharp, S., Thomsen, B.V., Tan, E., Payeur, J.B., 2005. Fatal mycobacteriosis with hepatosplenomegaly in a young dog due to *Mycobacterium avium*. *J. Vet. Diagn. Invest* 17, 200-204.
- Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M., Cvetnic, Z., 2003. Tuberculosis in cattle caused by IS901+*Mycobacterium avium* subsp. *avium* - a case report. *Vet. Med. (Praha)* 48, 47-50.
- Oliveira, R.S., Sircili, M.P., Oliveira, E.M., Balian, S.C., Ferreira-Neto, J.S., Leao, S.C., 2003. Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based restriction fragment length polymorphism and restriction analysis of *hsp65*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 44-49.
- Olmstead L.A., Rhode P.W., 2004. An impossible undertaking: The eradication of bovine tuberculosis in the United States. *The Journal of Economic History* 64, 1-39.
- Oloya, J., Kazwala, R., Lund, A., Opuda-Asibo, J., Demelash, B., Skjerve, E., Johansen, T.B., Djonje, B., 2007. Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC. Microbiol.* 7, 95.
- Olsen, I., Wiker, H.G., Johnson, E., Langeggen, H., Reitan, L.J., 2001. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 53, 198-203.

- Olsen, I., Wiker, H.G., Johnson, E., Langeggen, H., Reitan, L.J., 2003. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against MPP14, a 14 kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Acta Vet. Scand.* 44, 287.
- Packe, G.E., Innes, J.A., 1988. Protective effect of BCG vaccination in infant Asians: a case-control study. *Arch. Dis. Child* 63, 277-281.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res.* 65, 1483-1489.
- Paolicchii, F.A., Cirone, K., Marsella, C., Gioffre, A., Cataldi, A., Romano, M., 2006. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from commercial pasteurised milk. In: Manning, E.J., Nielsen, S.S. (Eds.), *Proc. 8th. Int. Coll. Paratub.* Madison, WI, USA.
- Paolicchii, F.A., Zumarraga, M.J., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M., 2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 20-26.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet. Microbiol.* 97, 123-133.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., de Mendoza, J.H., 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet. Microbiol.* 110, 293-300.
- Patton, E., Knust, B., Konkle, D., Bohn, J., Wells, S., 2007. Johne's disease vaccination: a valuable tool in managing Johne's disease. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Pattyn, S.R., ntoine-Portaels, F., Kageruka, P., Gigase, P., 1970. *Mycobacterium microti* infection in a zoo-llama: *Lama vicugna* (Molina). *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 51, 17-24.
- Paustian, M.L., Kapur, V., Sreevatsan, S., Bannantine, J.P., 2007. Draft genome sequence of an ovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolate. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Pavlas, M., 1981. [Use of allergological diagnosis in the elimination of tuberculosis from poultry kept in a small flock]. *Vet. Med. (Praha)* 26, 731-736.
- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of

- Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. Vet. Microbiol. 45, 311-318.
- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du, M.R., Rychlik, I., 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods 38, 155-167.
- Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., Dvorska, L., Rychlik, I., 2000. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 212-217.
- Pearce, L.E., Truong, H.T., Crawford, R.A., Yates, G.F., Cavaignac, S., de Lisle, G.W., 2001. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3964-3969.
- Picardeau, M., Varnerot, A., Lecompte, T., Brel, F., May, T., Vincent, V., 1997. Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. J Clin. Microbiol. 35, 2503-2510.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2130-2139.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Bull, T.J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., Hermon-Taylor, J., 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4067-4077.
- Pillai, S.R., Jayarao, B.M., 2002. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J. Dairy Sci. 85, 1052-1057.
- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet. J 163, 115-127.
- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D., McNair, J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. Vet. Microbiol. 112, 141-150.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 37-43.

- Polymeros, D., Bogdanos, D.P., Day, R., Arioli, D., Vergani, D., Forbes, A., 2006. Does cross-reactivity between *Mycobacterium avium paratuberculosis* and human intestinal antigens characterize Crohn's disease? *Gastroenterology* 131, 85-96.
- Prasad, H.K., Singhal, A., Mishra, A., Shah, N.P., Katoch, V.M., Thakral, S.S., Singh, D.V., Chumber, S., Bal, S., Aggarwal, S., Padma, M.V., Kumar, S., Singh, M.K., Acharya, S.K., 2005. Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85, 421-428.
- Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O., III, 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 98-106.
- Prodinger, W.M., Eigentler, A., Allerberger, F., Schonbauer, M., Glawischnig, W., 2002. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2270-2272.
- Pryor, M., Springthorpe, S., Riffard, S., Brooks, T., Huo, Y., Davis, G., Sattar, S.A., 2004. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci. Technol.* 50, 83-90.
- Quirke, P., 2001. Antagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 49, 757-760.
- Rademaker, J.L., Vissers, M.M., Te Giffel, M.C., 2007. Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4185-4190.
- Radkowski, M., Uradzinski, J., Sztejn, J., 1996. The occurrence of infectious and parasitic diseases in poultry slaughtered in the district of Olsztyn, Poland, 1986-91. *Avian Dis.* 40, 285-289.
- Rahim, Z., Mollers, M., te Koppele-Vije, A., de, B.J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., Van, S.D., Baqi, M.A., Heilmann, F.G., van der Zanden, A.G., 2007. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 706-713.
- Raizman, E.A., 2007. *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease: that's what epidemiology is all about. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Raja, A., 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 120, 213-232.
- Raman, V.S., O'Donnell, J., Bailor, H.R., Goto, W., Lahiri, R., Gillis, T.P., Reed, S.G., Duthie, M.S., 2009. Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. *Infect. Immun.* 77, 5623-5630.
- Ramos, A., Noblejas, A., Martín, T., Varela, A., Daza, R., Samper, S., 2004. Prolonged survival of an HIV-infected patient with multidrug-resistant

- Mycobacterium bovis* infection treated with surgical resection. Clin. Infect. Dis. 39, e53-e55.
- Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C., 2001a. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. 20, 21-54.
- Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C., 2001b. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. 20, 21-54.
- Ratcliffe, L.T., Lukey, P.T., MacKenzie, C.R., Ress, S.R., 1994. Reduced NK activity correlates with active disease in HIV- patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. Clin. Exp. Immunol. 97, 373-379.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., Jones, S., 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. Vet. Microbiol. 115, 77-90.
- Reed, G.B., 1957. Genus *Mycobacterium* (species affectin warm-blooded animal except those causing leprosy). In: R.S.Breed, E.G.D.M., N.R.Smith (Eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co..
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B.J., Ninet, B., Hirschel, B., Emler, S., 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 36, 1761-1764.
- Reviriego Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. Vet. Microbiol. 112, 101-109.
- Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Dominguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. Prev. Vet. Med. 43, 43-51.
- Richardson, G.D., Links, I.I., Windsor, P.A., 2005. Gudair (OJD) vaccine self-inoculation: a case for early debridement. Med. J. Aust. 183, 151-152.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.J., Mei, L., Nicolae, D.L., Regueiro, M., Schumm, L.P., Steinhart, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J., Brant, S.R., 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat. Genet.
- Ritacco, V., Kremer, K., Van der, L.T., Pijnenburg, J.E., de Haas, P.E., van Soolingen, D., 1998. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2, 242-251.
- Robles, P., Esteban, J., Fernández, M.L., 2002. Pulmonary tuberculosis due to multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* in a healthy host. CID 35, 212-213.

- Rodríguez, E., Sanchez, L.P., Perez, S., Herrera, L., Jimenez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J., 2009a. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 1536-1541.
- 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. *Vet. Microbiol.* 141, 89-95.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Alvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2009b. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet. Microbiol.*
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., Bottger, E.C., 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 323-330.
- Romero, B., Aranaz, A., De Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gomez-Mampaso, E., Dominguez, L., 2006. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Isolates with the Same Spoligotyping Profile as Isolates from Animals. *J Clin. Microbiol.* 44, 3405-3408.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J.F., Naser, S.A., 2005. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11, 116-125.
- Rook, G.A., Dheda, K., Zumla, A., 2005. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* 23, 2115-2120.
- Rullán, J.V., Herrera, D., Cano, R., Moreno, V., Godoy, P., Peiró, E.F., Castell, J., Ibáñez, C., Ortega, A., Agudo, L.S., Pozo, F., 1996. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 125-129.
- Runyon, E.H., 1967. *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir Dis.* 95, 861-865.
- Ryan, P., Bennett, M.W., Aarons, S., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., Shanahan, F., 2002. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* 51, 665-670.
- Ryan, P., Kelly, R.G., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J.,

- Shanahan, F., 2004. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease—detection by laser capture microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1539-1543.
- Ryan, T.J., Livingstone, P.G., Ramsey, D.S., de Lisle, G.W., Nugent, G., Collins, D.M., Buddle, B.M., 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* 112, 211-219.
- Sable, S.B., Cheruvu, M., Nandakumar, S., Sharma, S., Bandyopadhyay, K., Kellar, K.L., Posey, J.E., Plikaytis, B.B., Amara, R.R., Shinnick, T.M., 2011. Cellular Immune Responses to Nine *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine Candidates following Intranasal Vaccination. *PLoS. ONE.* 6, e22718.
- Sahraoui, N., Muller, B., Guetarni, D., Boulahbal, F., Yala, D., Ouzrout, R., Berg, S., Smith, N.H., Zinsstag, J., 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC. Vet Res.* 5, 4.
- Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., Tasaka, H., Dawson, D.J., 1990. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1694-1697.
- Saitoh, T., Akira, S., 2010. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol.* 189, 925-935.
- Sanderson, J.D., Moss, M.T., Tizard, M.L., Hermon-Taylor, J., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33, 890-896.
- Sanson, R.L., 1988. Tuberculosis in goats. *Surveillance* 15, 7-8.
- Sartor, R.B., 2005. Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease? *Gut* 54, 896-898.
- Sato, Y., Aoyagi, T., Matsuura, S., Fukui, S., Kitazawa, I., Nishimori, K., Yokomizo, Y., 1996. An occurrence of avian tuberculosis in hooded merganser (*Lophodytes cucullatus*). *Avian Dis.* 40, 941-944.
- Saxegaard, F., Baess, I., 1988. Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria". Determinations by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 96, 37-42.
- Saxegaard, F., Baess, I., Jantzen, E., 1988. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *APMIS* 96, 497-502.
- Scanlon, M.P., Quinn, P.J., 2000. The survival of *Mycobacterium bovis* in sterilized cattle slurry and its relevance to the persistence of this pathogen in the environment. *Irish Veterinary Journal* 53, 412-415.
- Scanu, A.M., Bull, T.J., Cannas, S., Sanderson, J.D., Sechi, L.A., Dettori, G.,

- Zanetti, S., Hermon-Taylor, J., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3883-3890.
- Schaad, U.B., Votteler, T.P., McCracken, G.H., Jr., Nelson, J.D., 1979. Management of atypical mycobacterial lymphadenitis in childhood: a review based on 380 cases. *J. Pediatr.* 95, 356-360.
- Schaefer, W.B., 1965. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am. Rev. Respir. Dis.* 92, 85-93.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 205-220.
- Schmidt, V., Schneider, S., Schlomer, J., Krautwald-Junghanns, M.E., Richter, E., 2008. Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. *Avian Pathol.* 37, 589-592.
- Schrenzel, M., Nicolas, M., Witte, C., Papendick, R., Tucker, T., Keener, L., Sutherland-Smith, M., Lamberski, N., Orndorff, D., Heckard, D., Witman, P., Mace, M., Rimlinger, D., Reed, S., Rideout, B., 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium intracellulare* in captive birds. *Vet. Microbiol.* 126, 122-131.
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., Naser, S.A., 2000. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 303-307.
- Scollard, D.M., Adams, L.B., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Truman, R.W., Williams, D.L., 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338-381.
- Sechi, L.A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A., Solinas, A., Fadda, G., Zanetti, S., 2001. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4514-4517.
- Sechi, L.A., Paccagnini, D., Salza, S., Pacifico, A., Ahmed, N., Zanetti, S., 2008. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteremia in type 1 diabetes mellitus: an infectious trigger? *Clin. Infect. Dis.* 46, 148-149.
- Sechi, L.A., Rosu, V., Paccagnini, D., Salza, S., Pacifico, A., Ahmed, N., Zanetti, S., 2007a. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with type-1 diabetes, a possible trigger. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* 9.
- Sechi, L.A., Rosu, V., Pacifico, A., Fadda, G., Ahmed, N., Zanetti, S., 2007b.

- Humoral immune responses of Type-1 Diabetes patients to *M. avium* subspecies *paratuberculosis* lend support to the infectious trigger hypothesis. Clin. Vaccine Immunol.
- Sechi, L.A., Scanu, A.M., Moliccotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G., Zanetti, S., 2005. Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. Am. J. Gastroenterol. 100, 1529-1536.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., Hetzel, D., 2007. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. Gastroenterology 132, 2313-2319.
- Selby, W.S., 2003. Current issues in Crohn's disease. Med. J. Aust. 178, 532-533.
- Semret, M., Turenne, C.Y., Behr, M.A., 2006a. Insertion Sequence IS900 Revisited. J. Clin. Microbiol. 44, 1081-1083.
- Semret, M., Turenne, C.Y., de Haas, P., Collins, D.M., Behr, M.A., 2006b. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 44, 881-887.
- Semret, M., Zhai, G., Mostowy, S., Cleto, C., Alexander, D., Cangelosi, G., Cousins, D., Collins, D.M., van Soolingen, D., Behr, M.A., 2004. Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. J. Bacteriol. 186, 6332-6334.
- Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. BMC. Microbiol. 7, 18.
- Shafran, I., Kugler, L., el-Zaatari, F.A., Naser, S.A., Sandoval, J., 2002a. Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. Dig. Liver Dis. 34, 22-28.
- Shafran, I., Piroballi, C., Decker, J.W., Sandoval, J., Naser, S.A., el-Zaatari, F.A., 2002b. Seroreactivities against *Saccharomyces cerevisiae* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* p35 and p36 antigens in Crohn's disease patients. Dig. Dis. Sci. 47, 2079-2081.
- Shanahan, F., 2002. Crohn's disease. Lancet 359, 62-69.
- Shanahan, F., O'Mahony, J., 2005. The mycobacteria story in Crohn's disease. Am. J Gastroenterol. 100, 1537-1538.
- Shankar, H., Singh, S.V., Singh, P.K., Singh, A.V., Sohal, J.S., 2007. Estimation of presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in un-pasteurized (individual and pooled milk) and commercial pas-

- teurized milk and milk products in India and its characterization using culture, ELISA and PCR. Proc. 9th. Int. Coll. Paratub. 9.
- Sharpe, A.E., Brady, C.P., Johnson, A.J., Byrne, W., Kenny, K., Costello, E., 2010. Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. Vet Rec. 166, 591-592.
- Shitaye, J.E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, M., Dvorska-Bartosova, L., Tremel, F., Lamka, J., Pavlik, I., 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. Vet. Microbiol. 127, 155-164.
- Shrikrishna, D., de, I.R.-D., Smith, N.H., Colloff, A., Coutts, I., 2009. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? Thorax 64, 89-91.
- Sintchenko, V., Gilbert, G.L., 2007. Utility of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in the contact investigation: a decision analysis. Tuberculosis. (Edinb.) 87, 176-184.
- Skinner, M.A., Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Keen, D., de Lisle, G.W., Tascon, R.E., Ferraz, J.C., Lowrie, D.B., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2003. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. Infect. Immun. 71, 4901-4907.
- SMITH, N., 1960. The 'Dassie' bacillus. Tubercle. 41, 203-212.
- Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J., 2009. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. J. Clin. Microbiol. 47, 2551-2559.
- Smith, N.H., Gordon, S.V., Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat. Rev. Microbiol. 4, 670-681.
- Soini, H., Eerola, E., Viljanen, M.K., 1996. Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex AccuProbe-positive isolates. J. Clin. Microbiol. 34, 55-57.
- Spahr, U., Schafroth, K., 2001. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4199-4205.
- Spangler, E., Heider, L.E., Bech-Nielsen, S., Dorn, C.R., 1991. Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. Am. J. Vet. Res. 52, 1197-1200.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 9869-9874.

- Srivastava, K., Chauhan, D.S., Gupta, P., Singh, H.B., Sharma, V.D., Yadav, V.S., Sreekumaran, Thakral, S.S., Dharamdheeran, J.S., Nigam, P., Prasad, H.K., Katoch, V.M., 2008. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India—possible relevance in human health. *Indian J. Med. Res.* 128, 26-31.
- Stabel, J.R., 2000. Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *J. Dairy Sci.* 83, 1659-1663.
- Stabel, J.R., 2001. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J. Dairy Sci.* 84, 524-527.
- Stabel, J.R., Lambertz, A., 2004. Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Food Prot.* 67, 2719-2726.
- Stahl, D.A., Urbance, J.W., 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172, 116-124.
- Stange, E.F., Travis, S.P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von, H.A., Warren, B.F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S.W., Scholmerich, J., Reinisch, W., 2006. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55 Suppl 1, i1-15.
- Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., Grant, I.R., 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.* 90, 3590-3595.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
- Sung, N., Collins, M.T., 2000. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1334-1339.
- Surcel, H.M., Troye-Blomberg, M., Paulie, S., Andersson, G., Moreno, C., Pasvol, G., Ivanyi, J., 1994. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 81, 171-176.
- Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J., Steer, K., 2006. *Mycobacterium microti* isolated from two pigs. *Vet. Rec.* 159, 59-60.
- Tell, L.A., Woods, L., Cromie, R.L., 2001. Mycobacteriosis in birds. *Rev. Sci. Tech.* 20, 180-203.
- Thegerstrom, J., Marklund, B.I., Hoffner, S., Axelsson-Olsson, D., Kauppinen, J., Olsen, B., 2005. *Mycobacterium avium* with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely in humans. *Scand. J Infect. Dis.* 37, 15-20.

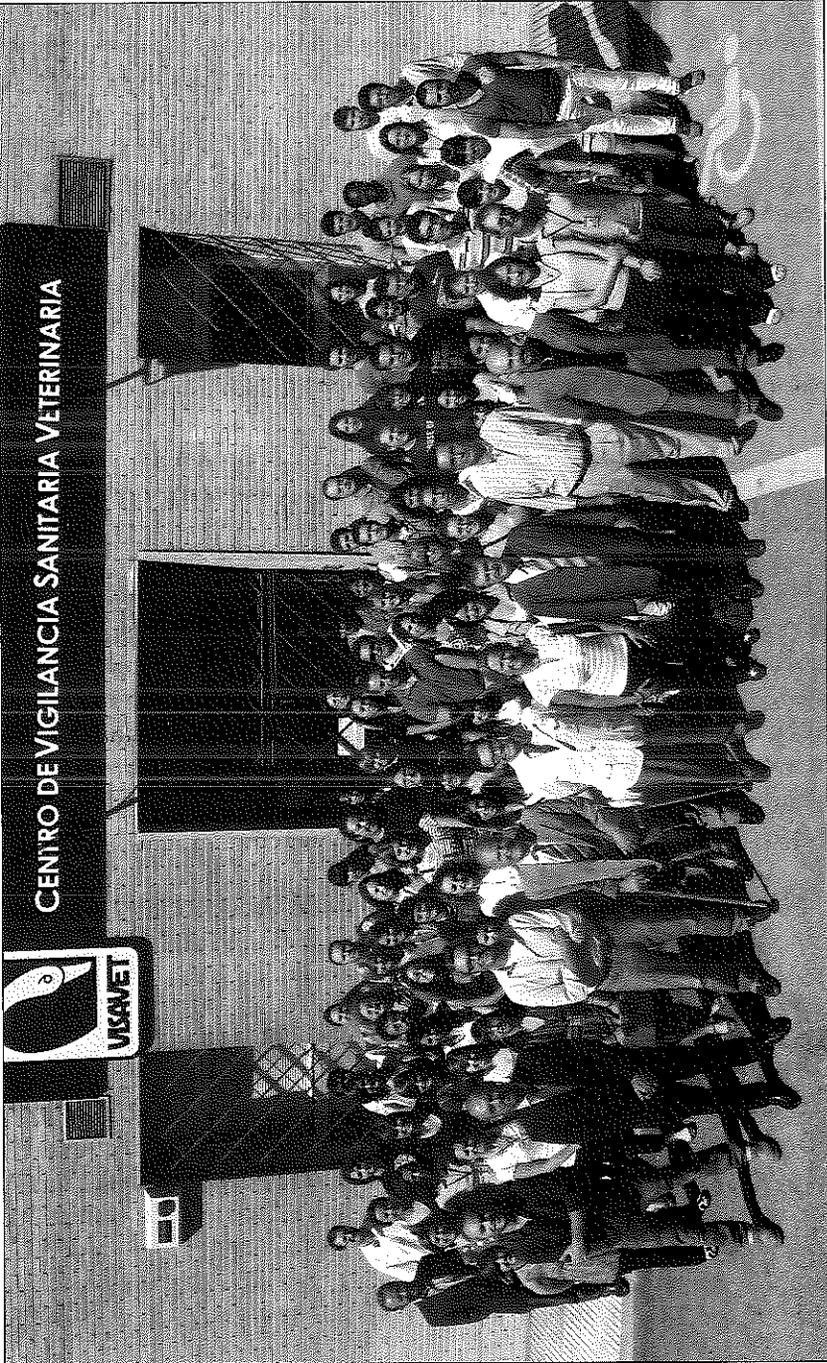
- Thompson, P.J., Cousins, D.V., Gow, B.L., Collins, D.M., Williamson, B.H., Dagnia, H.T., 1993. Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 164-167.
- Thorel, M.F., 1980. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle.* 61, 101-104.
- Thorel, M.F., 1984. Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann. Rech. Vet.* 15, 405-409.
- Thorel, M.F., Huchzermeyer, H., Weiss, R., Fontaine, J.J., 1997. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet. Res.* 28, 439-447.
- Thorel, M.F., Huchzermeyer, H.F., Michel, A.L., 2001. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 204-218.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 254-260.
- Tirkkonen, T., Pakarinen, J., Moisander, A.M., Makinen, J., Soini, H., Li-Vehmas, T., 2007. High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. *Vet. Microbiol.* 125, 175-181.
- Tizard, M., Bull, T., Millar, D., Doran, T., Martin, H., Sumar, N., Ford, J., Hermon-Taylor, J., 1998. A low G+C content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 144 (Pt 12), 3413-3423.
- Tompkins, D.M., Ramsey, D.S., Cross, M.L., Aldwell, F.E., de Lisle, G.W., Buddle, B.M., 2009. Oral vaccination reduces the incidence of tuberculosis in free-living brushtail possums. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2987-2995.
- Tortoli, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 319-354.
- Tortoli, E., 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 159-178.
- Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R.M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M.I., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C., 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1277-1285.

- Travis, S.P., Stange, E.F., Lemann, M., Oresland, T., Chowers, Y., Forbes, A., D'Haens, G., Kitis, G., Cortot, A., Prantera, C., Marteau, P., Colombel, J.F., Gionchetti, P., Bouhnik, Y., Turet, E., Kroesen, J., Starlinger, M., Mortensen, N.J., 2006. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 55 Suppl 1, i16-i35.
- Truman, R.W., Krahenbuhl, J.L., 2001. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69, 1-12.
- Turenne, C.Y., Semret, M., Cousins, D.V., Collins, D.M., Behr, M.A., 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 44, 433-440.
- Turenne, C.Y., Wallace, R., Jr., Behr, M.A., 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 205-229.
- Tutor-Ureta, P., Mellor-Pita, S., Yebra-Bango, M., Vargas, J.A., 2006. [Middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection: the Lady Windermere syndrome]. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 24, 590-591.
- Tzen, C.Y., Wu, T.Y., Tzen, C.Y., 2006. Detection of mycobacteria in Crohn's disease by a broad spectrum polymerase chain reaction. *J. Formos. Med. Assoc.* 105, 290-298.
- Ulrichs, T., Kaufmann, S.H., 2003. [Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines]. *Internist (Berl)* 44, 1374-1384.
- Une, Y., Mori, T., 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 415-425.
- Uzoigwe, J.C., Khaita, M.L., Gibbs, P.S., 2007. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol. Infect.* 135, 1057-1068.
- Vaerewijck, M.J., Huys, G., Palomino, J.C., Swings, J., Portaels, F., 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 911-934.
- Vallée, H., Rinjard, P., 2008. Etudes sur l'entérite paratuberculeuse des bovins. *Revue Générale de Médecine Vétérinaire* 409, 1-9.
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., van der Meer, J.W., 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 294-309.
- van Schaik G., Kalis, C.H., Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Huirne, R.B., 1996. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139, 624-627.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Haagsma, J., Eger, T., Hermans, P.W., Ritacco, V., Alito, A., van Embden, J.D., 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2425-2433.

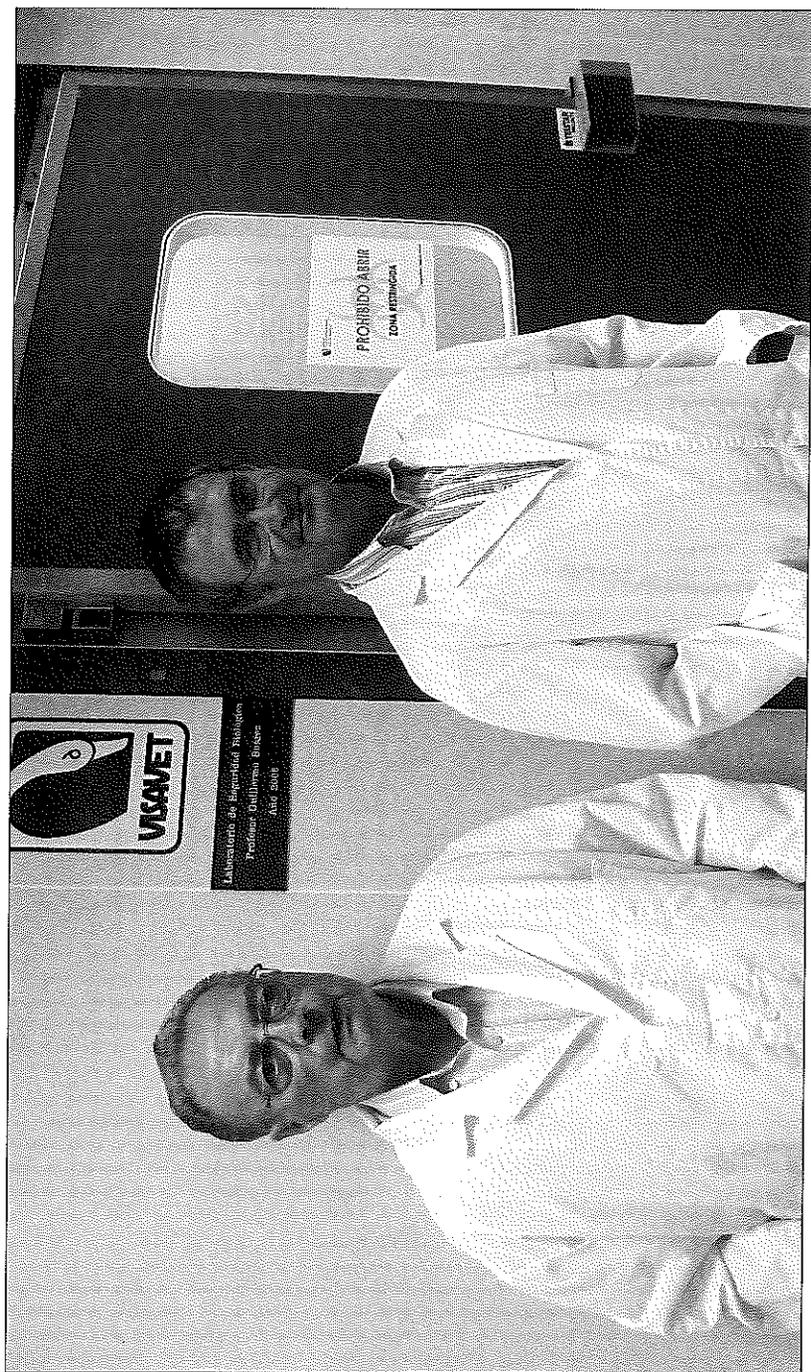
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D., 1997a. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J. Syst. Bacteriol.* 47, 1236-1245.
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D., 1997b. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J. Syst. Bacteriol.* 47, 1236-1245.
- van Soolingen, D., van der Zanden, A.G., de Haas, P.E., Noordhoek, G.T., Kiers, A., Foudraine, N.A., Portaels, F., Kolk, A.H., Kremer, K., van Embden, J.D., 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1840-1845.
- Vilaplana, C., Cardona, P.J., 2010. Tuberculin immunotherapy: its history and lessons to be learned. *Microbes. Infect.* 12, 99-105.
- Viljanen, M.K., Olkkonen, L., Katila, M.L., 1993. Conventional identification characteristics, mycolate and fatty acid composition, and clinical significance of MAIX AccuProbe-positive isolates of *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1376-1378.
- Von Reyn, C.F., Maslow, J.N., Barber, T.W., Falkinham, J.O., III, Arbeit, R.D., 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343, 1137-1141.
- von Reyn, C.F., Mtei, L., Arbeit, R.D., Waddell, R., Cole, B., MacKenzie, T., Matee, M., Bakari, M., Tvaroha, S., Adams, L.V., Horsburgh, C.R., Pallangyo, K., 2010. Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette-Guerin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. *AIDS* 24, 675-685.
- Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P.J., McAulay, M., Rhodes, S.G., Thacker, T., Gilbert, S.C., McShane, H., Hill, A.V., Xing, Z., Hewinson, R.G., 2009. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 77, 3364-3373.
- Waler, H.T., 1982. [Tuberculosis in the world]. *Bull. Int. Union Tuberc.* 57, 207-211.
- WAGNER, J.C., BUCHANAN, G., BOKKENHEUSER, V., LEVISEUR, S., 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181, 284-285.
- Walravens, K., Marche, S., Rosseels, V., Wellemans, V., Boelaert, F., Huygen,

- K., Godfroid, J., 2002. IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 401-406.
- Walzl, G., Ronacher, K., Hanekom, W., Scriba, T.J., Zumla, A., 2011. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 343-354.
- Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Palmer, M.V., Robbe-Austermann, S., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Whipple, D.L., Payeur, J.B., Estes, D.M., Pitzer, J.E., Minion, F.C., 2004. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11, 729-735.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Thacker, T.C., Scherer, C.F., Estes, D.M., Jacobs, W.R., Jr., Glatman-Freedman, A., Larsen, M.H., 2007. Failure of a *Mycobacterium tuberculosis* DeltaRD1 DeltapanCD double deletion mutant in a neonatal calf aerosol *M. bovis* challenge model: comparisons to responses elicited by *M. bovis* bacille Calmette Guerin. *Vaccine* 25, 7832-7840.
- Wayne, L.G., Good, R.C., Tsang, A., Butler, R., Dawson, D., Groothuis, D., Gross, W., Hawkins, J., Kilburn, J., Kubin, M., ., 1993. Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 482-489.
- Wayne, L.G., Sramek, H.A., 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 1-25.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., Moritz, A., Deng, M.Q., Abrahamsen, M.S., 2002. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 70, 5556-5561.
- Wells, A.Q., Oxen, D.M., 1937. Tuberculosis in voles. *Lancet* 1, 1221.
- Wentink, G.H., Bongers, J.H., Zeeuwen, A.A., Jaartsveld, F.H., 1994. Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41, 517-522.
- Whan, L., Ball, H.J., Grant, I.R., Rowe, M.T., 2005. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7107-7112.
- Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T., 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* 6, 63.
- Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R., Rowe, M.T., 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 227-231.

- Whelan, A.O., Wright, D.C., Chambers, M.A., Singh, M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2008. Evidence for enhanced central memory priming by live *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in comparison with killed BCG formulations. *Vaccine* 26, 166-173.
- Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell Probes* 12, 349-358.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240-3248.
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Fridriksdottir, V., 2001. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79, 311-322.
- Windsor, P.A., Bush, R., Links, I., Eppleston, J., 2005. Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 83, 216-220.
- Windsor, P.A., Eppleston, J., 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.* 54, 237-241.
- Wobeser, G., 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *Can. Vet. J.* 50, 1169-1176.
- Wolinsky, E., 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119, 107-159.
- Wong, K.C., Wu, L.T., 1932. *History of Chinese Medicine*. The Tientsin Press, Tientsin.
- Yamagami, H., Matsumoto, T., Fujiwara, N., Arakawa, T., Kaneda, K., Yano, I., Kobayashi, K., 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* 69, 810-815.
- Zakowski, P., Fligielski, S., Berlin, G.W., Johnson, L., Jr., 1982. Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* 248, 2980-2982.
- Zinsstag, J., Schelling, E., Roth, F., Bonfoh, B., de, S.D., Tanner, M., 2007. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 527-531.



Personal del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense. Junio de 2010



Área de contención biológica de Nivel 3 "Profesor Guillermo Suárez". Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de tuberculosis bovina. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid

CONTESTACIÓN
EXCMO. SR. DR.
D. GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ

Excelentísimo Señor Presidente
Excelentísimos Señores Académicos
Señoras y Señores:

Tengo el honor, en nombre de la Real Académica de Doctores de España, de dar la bienvenida al nuevo Académico de Número, D. Lucas Domínguez Rodríguez, elegido para ocupar el sillón número 74 adscrito a la Sección número 10 que corresponde a la Especialidad de Ciencias Veterinarias.

Nada tan grato como este tan honroso cometido al que se une la entrañable satisfacción que supone contestar al discurso de recepción de un colega y alumno directo en el más profundo de los sentidos y, por ello, testigo de excepción de los méritos que avalan y orlan su brillante trayectoria docente, científica y académica.

Nace el nuevo Académico en Cabezuela del valle, precioso pueblo extremeño, en 1955, hijo de Lucas y Nieves. Su padre era veterinario Titular y su madre maestra Nacional. Del padre heredó Lucas, además del nombre, una verdadera ensoñación por el mundo ganadero y rural, también expresado en su actividad docente e investigadora y de su madre la sensatez en el proceso reflexivo a nivel académico y organizativo.

Lucas Domínguez conserva gratos recuerdos de niñez y juventud en las localidades en las que su padre ejerció la profesión, tales como Membrillera en Guadalajara o Cabezuela del Valle en Cáceres, en los que cursa la enseñanza primaria y secundaria.

Los estudios de Bachillerato los cursa ya en Salamanca en el colegio de los Escolapios que finaliza con la selectividad en el Curso 1972-1973 y a partir de entonces, con entera libertad y por decisión propia envía su solicitud a través de la Universidad de Salamanca a la Universidad Complutense de Madrid, solicitando como primera opción la licenciatura de Veterinaria.

Lucas comienza los estudios con gran ilusión y junto a quien había de ser su gran amigo a lo largo de la licenciatura, Alberto Mamolar bilbaíno, eligen como asignatura preferente la de Microbiología e Inmunología veterinaria impartida por el insigne catedrático Profesor D. Eliseo Gastón de Iriarte a quien ambos amigos se ofrecieron como alumnos internos quién acepto al comprobar su gran vocación por la disciplina y serio compromiso de colaboración que comenzó a finales del curso 1974-75.

Me complace recordar este hecho por doble motivo. Mi amistad con D. Eliseo venía muy de antiguo pero se consolidó cuando quiso el destino que le sustituyese en dos cátedras, la primera en la Facultad de Farmacia de Barcelona y la segunda en la Facultad de Veterinaria de Madrid.

El segundo motivo nace del primero ya que D. Eliseo me recomendó a Lucas y Alberto como futuras promesas. Creo recordar que fue en Enero de 1977 cuando ambos alumnos me visitaron para pedirme que les facilitase un determinado aparato para seguir una investigación sobre microflora (hoy microbiota) de artrópodos.

Creo que accedí a comprarles el aparato a pesar de la penuria económica a sabiendas de la escasa posibilidad de éxito en su planteamiento. Simplemente, no quería negarles algo que fuese a desmotivar su incipiente ilusión investigadora.

Está claro que Lucas recuerda con nítida preferencia su años de Universidad frente a los periodos formativos anteriores.

En efecto, Lucas recuerda a ciertos profesores que contribuyeron más que otros a despertar su atracción hacia la docencia y la investigación, tales como Martín Roldan, González González, Varela Mosquera, Gastón de Iriarte, Sanz Pérez, Sanz Sánchez, Gallego García, Sanchez-Botija. Todos ellos pertenecieron a la enseñanza a nivel universitario de las Ciencias Veterinarias en la Facultad de Veterinaria de Madrid.

En el Curso 1978-79, cuando Lucas era ya profesor Ayudante de clases Prácticas, el Departamento de Microbiología e Inmunología pierde su inde-

pendencia y queda obligado a integrarse en nuestro actual Departamento de Sanidad Animal a consecuencia de una nueva estructura universitaria en Áreas de Conocimiento y de esta manera la Microbiología, Inmunología, Parasitología, Enfermedades Infecciosas y Parasitarias pasan a constituir el nuevo Departamento. A la hora de distribuir las enseñanzas Lucas y Alberto, ya profesores son los primeros en elegir la disciplina de Microbiología e Inmunología. Nadie podría imaginarse entonces que sus destinos se diversificarían de forma radical, pero sin olvidar su gran amistad. Y así mientras Lucas siguió fiel a su línea en el Departamento y Facultad en donde ha llegado a escalar las más altas cotas de prestigio universitario, Alberto Mamolar, su amigo nos abandonó al comienzo de la década de los años 80 del pasado siglo al opositar a una plaza de Veterinario Titular al Ayuntamiento de Bilbao. Alberto ganó la oposición con una gran brillantez y doy fe como miembro que fui del Tribunal de Oposición.

Una gran pérdida para el Departamento. No para Alberto que ha sabido rodearse de un gran prestigio profesional en todo el País Vasco.

Lucas, afectado en principio por el alejamiento de su amigo, supo reaccionar enfrentándose a las dificultades de una carrera docente e investigadora en tiempos difíciles y su decisión y valentía le abrieron las puertas del éxito tanto en la docencia como en la investigación acreditando un magnífico historial científico.

Los pasos fundamentales en su carrera profesional y universitaria comienzan en el año 1978 como Ayudante de clases Prácticas seleccionado por concurso de méritos, colaborador científico, Profesor Titular interino, Profesor Titular por concurso oposición, 1985 y catedrático de Universidad por concurso posición en 1989. En paralelo, con idéntica rapidez y progreso evoluciona su responsabilidad como investigador de tal manera que hoy en día cuenta con más de 300 publicaciones preferentemente en revistas Internacionales con "referee" y de notable prestigio.

Ha dirigido 22 Tesis doctorales y numerosos Proyectos de Investigación y en el año 2007 alcanza el máximo de tramos de investigación (5) y de docencia (6), lo que le ha estimulado para seguir con ahínco su magisterio universitario en ambos conceptos docente e investigador.

La labor de Lucas como asesor ministerial en temas de Sanidad Animal o de carácter agrícola-ganadero se podría definir como de una actividad que nos atrevemos a calificar de trepidante.

En este punto les confirmo mi promesa de brevedad porque siempre que he pasado por el trance de contestación al discurso de recepción académica, no me he olvidado nunca que el recipiendario es la principal figura del acto.

Para terminar, por tanto, me referiré al magnífico y bien documentado discurso científico sobre enfermedades causadas por micobacterias.

En el Departamento de Sanidad Animal y en el grupo de investigación que contribuimos a crear, a lo largo de 25 años, se han cultivado varios temas de investigación en Tesis Doctorales o determinados Proyectos de Investigación, pero estimo que hay dos temas que dentro de las disciplinas de Microbiología e Inmunología han acreditado definitivamente al Departamento en su vertiente microbiológica.

Estos temas son la Epidemiología de la Listeriosis y la Etiopatogenia de las Micobacteriosis.

En el estudio de la Listeriosis lo había iniciado personalmente en 1974 en la Facultad de Farmacia de Barcelona y al trasladarme a Madrid en el año 1977 quise continuarlo en nuestro Departamento con el grupo de Microbiólogos.

En aquellos años el estudio de un microorganismo tan ubicuitorio como *L. monocytogens* era muy interesante desde el punto de vista científico pero no ocasionaba problemas sanitarios graves a no ser en la Sanidad Animal.

Quiso el destino que en los años 80 del pasado siglo aparecieran focos de Listeriosis humana sucesivamente en Canadá, EE.UU, Suiza, Francia e Inglaterra.

Estos brotes fueron ocasionados por el consumo de diferentes alimentos, leche, queso, “coleslaw” diversos alimentos precocinados y así enfermaron varios centenares de personas.

La elevada letalidad ocasionada en las personas afectadas, en torno al 30%, el hecho de que los brotes aparecieran en países de alto nivel económico y sanitario así como el origen alimentario de los “outbreaks” desencadenó un gran temor en la industria alimentaria y en la población que alcanzó, precisamente en los países afectados un verdadero “miedo cervical”. La prensa americana se refería a la “histeria de la listeria”.

El estudio de la Listeriosis cobró un gran interés y podemos afirmar que el

grupo de Microbiología del Departamento de Sanidad Animal contribuyó brillantemente al estudio del proceso infeccioso con cientos de publicaciones en las que figuraba en lugar destacado el nombre de Lucas Domínguez Rodríguez.

El segundo tema en que tiene una clara participación el recipiendario Lucas Domínguez se centra en la década de los años 90 del siglo XX en la Tuberculosis Bovina, Paratuberculosis caprina y otras micobacteriosis.

Mientras que el tema de la Listeriosis ha perdido interés al haberse logrado una eficaz prevención y control de la enfermedad humana por *L. monocytogenes* el tema de las Micobacterias ha cobrado un interés máximo dentro del Departamento de Sanidad Animal, que es el Departamento que mayor número de Proyectos de Investigación ha dirigido entre los de la Universidad Complutense según manifestaron los dos últimos Rectores.

La afortunada entrada en la investigación de las micobacterias parte de un grupo de microbiólogos estimulados con un Proyecto de Investigación financiado por el FISS dirigido por el profesor Lucas Domínguez Rodríguez, referido al Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. El desarrollo del Proyecto dio lugar a varias publicaciones en el *International Systematic Microbiology* y otras series de revistas de gran nivel científico.

A finales de la década de los mencionados años 90 se organiza por el Departamento de Sanidad Animal una reunión científica sobre micobacterias en el Escorial con asistencia de 37 laboratorios europeos interesados en el tema micobacterias. Como resultado de la misma se solicita una acción concertada de 1999-2003, siendo D. Lucas Domínguez Rodríguez el Investigador Principal. A esta Acción sigue otra 2004-2009 siguiendo Lucas como investigador principal.

A estas acciones concertadas, han seguido otras coordinadas por el laboratorio de Micobacterias del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense.

El éxito de coordinar repetidamente a 37 laboratorios europeos animó al Prof. Lucas Domínguez y a sus colaboradores a crear un nuevo centro dependiente de la Universidad Complutense a través del Departamento de Sanidad Animal, un centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria que es en estos momentos, una de las instalaciones científicas más importantes de Europa en el Campo de Sanidad Animal.

En España no existe en ninguna Universidad Española un centro de Investigación que tenga un nivel de Seguridad Biológica superior a 3, como VISAVET cuya cámara de Seguridad lleva inmerecidamente mi nombre.

Este Centro con su trascendencia europea y mundial ha jugado un papel muy importante en la calificación de Excelencia en la Investigación para el “Campus” Universitario de Moncloa.

Este éxito corresponde y de manera muy principal al Profesor Lucas Domínguez Rodríguez.

Decía Séneca, glorioso filósofo cordobés “Nunca se descubrirá nada si estuviésemos satisfechos con lo descubierto”. Conocedor de las cualidades humanas y científicas estimamos que Lucas continuará en su línea de invención, lo que ha de redundar en beneficio de esta centenaria institución, que tanto se viene ocupando de impulsar los estudios de Doctorado como único pórtico de entrada a la investigación universitaria así como del propio conocimiento científico y multidisciplinar.

Por ello y, en nombre de esta Real Academia de Doctores de España de la que nos sentimos muy honrados en pertenecer y en el mío personal le damos la más cordial bienvenida. He dicho.