

Aspectos zoonóticos de la epidemiología de la tuberculosis en España

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Región de Murcia
Consejería de Sanidad

Dirección General de Salud Pública
Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis



ASPECTOS ZONÓTICOS DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS EN ESPAÑA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Autor: Pedro Antonio Balanza Vicente
Coordinador: Blas A. Marsilla de Pascual

Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis
Dirección General de Salud Pública
Consejería de Sanidad

ISBN: 84-95393-47-6

Depósito Legal: MU-2414-2004

Imprime: Imprenta Regional

Agradecimientos

A los profesores D. Luis León Vizcaino y D. Juan Seva Alcaraz, de la Universidad de Murcia, por su inestimable ayuda al facilitarme el acceso a parte de la bibliografía, amén de sus consejos.

A la investigadora D.^a M.^a Soledad Jiménez Pajares, del Instituto de Salud Carlos III, por sus orientaciones sobre las técnicas moleculares.

A José Ramón Tauste Carrión y Jaime Martínez Uceda, por su ayuda en la confección de tablas y gráficos y en la aplicación de formato.

AGRADECIMIENTOS

1. INTRODUCCIÓN	7
2. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3. RESULTADOS	11
4. DISCUSIÓN	23
Figuras y tablas	31
5. BIBLIOGRAFÍA	35

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta al hombre y a los animales, producida por bacterias del género *Mycobacterium*, cuyas principales especies, desde el punto de vista patogénico, son:

- ***M. tuberculosis***. Causa la enfermedad principalmente en el hombre, al igual que
- ***M. africanum***. (Variedades I y II).
- ***M. microti***. Afecta a roedores.
- ***M. bovis***. Afecta principalmente a rumiantes domésticos y salvajes.
- ***M. avium***. Infecta principalmente a aves, y también al cerdo.

Las cuatro primeras especies integran el llamado *Complejo M. tuberculosis* (Complejo CMTB).

(7)

Se trata de bacilos aerobios, móviles, Gram +, alcohol-ácido resistentes, no esporulados, pero muy resistentes a factores adversos del medio ambiente, (deseccación, determinados desinfectantes, etc.), debido al alto contenido en lípidos de su pared. Estas características condicionan la epidemiología de la enfermedad, al facilitar la persistencia de los bacilos en el medio (1).

La enfermedad se conoce desde las primeras civilizaciones. La primera referencia sobre tuberculosis animal es la descripción de *Columela*, en el año 40, pero hasta el siglo XIX no se relacionó con la "tisis" humana. Ya en 1797, *Klenke* vinculó el consumo de leche de vaca y la aparición de lesiones. *Gurlt* (1831), *Hering* (1849), y *Fuchs* (1859), consideraron la tuberculosis vacuna esencialmente igual a la forma pulmonar humana. *Villemin*, en 1868, describió el carácter zoonótico de la tuberculosis al confirmar la transmisibilidad del hombre a los animales y viceversa, y reproducir la enfermedad en conejos y cobayas tras la inoculación de material patógeno de procedencia humana y animal. Finalmente, en 1882, *Koch* descubre el bacilo tuberculoso, demostrando la etiología bacteriana de la enfermedad, y en 1890 desarrolló la tuberculina para reacción dérmica como medio diagnóstico, utilizada todavía en nuestros días (2).

La tuberculosis en el mundo está muy lejos de estar erradicada. En los animales de abasto causa considerables pérdidas, a pesar de que la incidencia ha disminuido mucho en los últimos decenios, desde que se pusieron en marcha las campañas de saneamiento



ganadero. En cuanto a la tuberculosis humana, sigue siendo un problema mundial de primera magnitud, que causa, según la OMS, más muertes que el tifo, el cólera y la malaria juntos (casi 2 millones de personas mueren anualmente); cada año aparecen más de 8 millones de nuevos casos (8,4 en 1999). En el mundo occidental el número de casos es muy inferior al de los países en desarrollo, aunque existe un resurgimiento en los países industrializados, debido a cambios en la estructura socio-poblacional, inmigración, aumento de los casos de infección de VIH, aparición de resistencias a fármacos, e incluso por declive de los programas de lucha y de las estructuras sanitarias (2).

En el caso de España, la importancia es aún mayor, ya que es el segundo país de la UE con mayor incidencia, a niveles poco congruentes con su nivel de desarrollo. Se estima que en España aparecen cada año entre 30 y 50 nuevos casos por cada 100.000 habitantes (OMS), cifras sensiblemente superiores a las que arrojan las declaraciones oficiales.

La habilidad del género *Mycobacterium* para infectar uno o más hospedadores heterólogos, es decir, aquellos que, a priori no les corresponderían, hace de la tuberculosis en cualquier especie animal una amenaza potencial para otras especies, incluido el hombre. De hecho, la transmisibilidad de las infecciones tuberculosas a otras especies distintas del hospedador "natural", constituye uno de los problemas más importantes en el control de esta enfermedad (3), si bien son relativamente específicas de hospedador, de tal modo que el poder para infectar heterológicamente es mucho menor, estando condicionado por otros factores como hacinamiento, altas dosis infectivas, o inmunodepresión. Así, *M. bovis* puede afectar al hombre, al igual que *M. tuberculosis* a otras especies animales. (2). Además, es fundamental el papel de los animales en la transmisión de la tuberculosis al hombre y viceversa, no sólo como transmisores directos, sino como reservorios, resultando una red de interrelaciones interespecífica que complica mucho la epidemiología de la tuberculosis, y por tanto la lucha contra ella (Figura 1).

Por último, es de destacar la pérdida de importancia relativa del ganado vacuno en la transmisión de la enfermedad al hombre, ya que las campañas de lucha en esta especie han disminuido mucho la prevalencia, además de haberse generalizado las medidas de higiene y seguridad alimentaria en cuanto al consumo de leche fresca y derivados. Paralelamente, han adquirido mayor relevancia especies salvajes en contacto más o menos directo con los animales y el hombre, especialmente los cérvidos y el jabalí, así como el tejón en determinados países. De igual modo, ha cobrado gran importancia el ganado caprino, especie fundamental desde el punto de vista zoonótico en España, y sobre todo en la Región de Murcia, debido al censo, considerable y bastante disperso, y a la elevada casuística de tuberculosis, aunque sea relativamente reciente su estudio y consideración. La tuberculosis caprina ha sido ignorada y a menudo confundida con otros procesos respiratorios como bronquitis verminosas o bronconeumonías, lo que hizo en algunas zonas albergar la falsa idea de que la cabra era particularmente resistente al bacilo tuberculoso (4).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La revisión bibliográfica ha sido realizada mediante búsqueda de artículos científicos en la base de datos de “MEDLINE”, a través del servidor “Pub-Med”. El término principal con el que se inició la búsqueda fue “tuberculosis”. Los criterios de selección y búsqueda han sido: “Tuberculosis animal y humana”, “la enfermedad como zoonosis”, “Epidemiología de la tuberculosis”, “Transmisión interespecífica”, “La enfermedad en el ganado caprino” y, finalmente, “Diagnóstico”, especialmente, “Diagnóstico Molecular”. Se desecharon los artículos sobre casos clínicos, aspectos de la enfermedad puramente humanos, anatomía patológica, tratamiento, etc., por considerarlos fuera de los objetivos básicos del presente trabajo, relacionados más bien con la transmisión entre hombres y animales y la epidemiología molecular.

(9)

Para la búsqueda de datos estadísticos oficiales relacionados con la incidencia de la enfermedad en la población humana española, se ha realizado la consulta de los artículos científicos relacionados publicados en el Boletín Epidemiológico Semanal del Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo), desde el año 2000 al 2004. Además, se han consultado en dicho boletín los datos referentes a nuevos casos de tuberculosis en España, que semanalmente se vuelcan y se incluyen junto con los casos de otras enfermedades de declaración obligatoria.

Por último, consultando los libros sobre zoonosis, archivos bibliográficos, artículos descatalogados, y tesis doctorales relacionadas con la tuberculosis en animales domésticos, salvajes y como zoonosis, todo ello en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

En cuanto a la bibliografía encontrada por cada apartado estudiado, se han hallado pocos trabajos relacionados con la zoonosis como tal, es decir, estudiando la transmisión entre los animales y el hombre de *M. bovis*, habiendo sido necesario recurrir a bibliografía antigua, y curiosamente en un número parecido a aquellas que hacen referencia a la misma transmisión, pero de *M. tuberculosis*. En cambio, la literatura sobre epidemiología molecular y diagnóstico por tipificación es muy variada. No obstante, suelen tratar, bien la transmisión entre especies animales, o bien de persona a persona, siendo más escasos los artículos que estudian la infección zoonótica entre hombres y animales, demostrándola mediante la identificación de especie, variedad e incluso genotipo. Por lo que respecta al estudio de las infecciones por *M. bovis* y de su variedad *caprae*, los trabajos son abun-



dantes con animales, pero escasos en el caso de estudios en personas. Por último, en cuanto al diagnóstico, utilizando técnicas genéticas o serológicas, también es muy grande el número de los que se dedican más bien a estudiar la técnica en sí, su sensibilidad y especificidad, pero menos los que aplican las técnicas a investigaciones experimentales con obtención de resultados.

3. RESULTADOS

A) Epidemiología de la Tuberculosis zoonótica

El ganado vacuno se considera el verdadero hospedador de *M. bovis*. Sin embargo, la enfermedad ha sido descrita en otras varias especies; así, en Europa y Estados Unidos, se ha podido aislar el bacilo en cerdos, gatos, perros, caballos y el hombre, así como en animales salvajes con ciclos ecológicos cercanos al hombre y los animales domésticos, tales como el ciervo, jabalí, visón, tejón, búfalo, etc. (5).

El hombre adquiere la infección a partir del principal reservorio, el vacuno, con la vía digestiva como principal modo de transmisión (consumo de leche y productos lácteos crudos), y, en segundo término, por vía aerógena. Se ha constatado infección por el bacilo bovino en la mayor parte de los países que tipifican las cepas causantes de tuberculosis en el hombre. La incidencia de la tuberculosis pulmonar causada por dicho bacilo es más alta, como cabría esperar, en granjeros que en población urbana. Varios estudios de algunos países sudamericanos indican que la infección humana por *M. bovis* es relativamente frecuente, a pesar del hábito extendido en esos países de hervir la leche. Esto se explica porque los productos lácteos son preparados frecuentemente con leche cruda o incorrectamente pasterizada, y porque la enfermedad puede transmitirse al hombre a través de otras vías, principalmente la inhalatoria. Además, se registran casos en América Latina de tuberculosis pulmonar (si bien no suele estabularse el ganado), especialmente en el caso de obreros rurales y de mataderos (6,7).

En un estudio epidemiológico realizado por investigadores del Instituto Pasteur de Lille, se analizaron casos de tuberculosis humana causados por *M. bovis* en 25 países entre los años 1954 y 1970, hallando valores comprendidos entre un 25.9% y un 0.09%. Más del 2% de los casos eran de origen pulmonar y algo más del 9% de origen extrapulmonar, lo cual concede más importancia a la vía digestiva que a la inhalatoria, al menos en esos años (Tabla 1) (8).

En estudios realizados en los Estados Unidos, se ha comprobado que la infección por el bacilo bovino es infrecuente, y se da principalmente en personas de edades entre 50 y 80 años, que fueron infectadas antes de la generalización de la tuberculinización del ganado y de la pasterización de la leche (9). En otros trabajos desarrollados en Suecia y Alemania, se investigó si el riesgo de la infección tuberculosa en personas estaba rela-



cionado con la prevalencia de infección en el ganado vacuno, hallándose que en efecto existía tal relación (10,11).

De acuerdo con Feldman (9), se puede concluir que *M. bovis* es todavía un importante agente patógeno para el hombre, a pesar de haber disminuido considerablemente la incidencia de infección en el hombre, de manera paralela al descenso en el ganado vacuno, que puede producir muchas formas de tuberculosis, predominando las formas extrapulmonares, aunque también se presentan formas clásicas respiratorias, y que la vaca lechera puede suponer una seria amenaza para la salud pública en ausencia de las medidas oportunas. Mucho más recientemente, P. Martín y L. León resaltan la baja prevalencia de la enfermedad en el vacuno en España, por la aplicación de campañas de erradicación. Sin embargo, destacan la gran importancia en el ganado caprino, y el riesgo epidemiológico como posible fuente de infección (2), coincidiendo con P. Acha (1), que afirma que las cabras pueden constituir una fuente de infección, aunque secundaria al vacuno, para el hombre. También que el hombre infectado por *M. bovis* y que padece la forma pulmonar o urogenital, (las más frecuentes), puede retransmitir la infección al bovino, especialmente en las últimas etapas de erradicación de la tuberculosis bovina, cuando la prevalencia es ya muy baja. Se sostiene que en países donde disminuye el nivel de infección humana por *M. tuberculosis* y no se controla adecuadamente la infección en el ganado vacuno, *M. bovis* podría adquirir un papel preponderante en la tuberculosis pulmonar del hombre. Por último, sostiene que la tuberculosis de porcinos, caprinos y ovinos tiene como fuente principal de infección a los bovinos y aves, y a veces al hombre, con lo que se insiste en la transmisión de la infección por *M. bovis* de los animales al hombre y viceversa, si bien la transmisión interhumana de la tuberculosis animal es excepcional, y hasta la fecha poco clara. De hecho existen, aunque pocos, casos documentados que describen esta transmisión de persona a persona: En un brote hospitalario entre pacientes inmunodeprimidos (12), y en un reciente artículo sobre Epidemiología molecular de *M. bovis* del Reino Unido, en el que se describe una transmisión entre hermanos, en la que el receptor de la infección no había tenido contacto con ganado. Se piensa que éste puede ser el primer caso de transmisión interhumana de *M. bovis* desde 1990 (13).

(12)

En cuanto a *M. tuberculosis*, aunque el bovino es sumamente resistente a la infección, y no suele ocasionarle lesiones, sí que puede jugar un importante papel en la epidemiología de la tuberculosis humana, ya que se ha comprobado su papel como reservorio, al haberse aislado de ganglios linfáticos de animales tuberculín-positivos.

Estudios realizados en la República Federal de Alemania entre 1968 y 1972, demuestran la transmisión del hombre a los animales, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis* (14).

Se ha podido aislar *M. bovis* de perros y gatos expuestos a ganado vacuno afectado de tuberculosis. Las personas en contacto con aquéllos mostraron una tasa significativamente superior de reacción a la tuberculina a la de la población general (15). Otros reservorios del bacilo bovino son los animales exóticos y de zoológico, habiéndose llegado a describir su aislamiento de muchas especies en diversos trabajos de Europa y Estados Unidos (16,17). Además, según informe del "U.S. Public Health Service", la tasa de convertidores a la tuberculina es 27 veces mayor entre los trabajadores de laboratorio en contacto con monos

que para la población general (18). En un estudio realizado por el Departamento de Salud de California se estudió la infección tuberculosa debida a exposición humana a diversas especies animales en el zoológico de Los Ángeles entre los años 1997 y 2000; se diagnosticó *M. tuberculosis* en dos elefantes asiáticos, tres cabras de las Montañas Rocosas y un rinoceronte negro, con técnicas de identificación de ADN, que sugirieron transmisión reciente. Se investigó y no se encontraron casos de tuberculosis en humanos, si bien las conversiones a la prueba dérmica de la tuberculina se asociaron con el adiestramiento de los elefantes y la realización de la necropsia a uno de ellos (19). Anteriormente, en estudios realizados entre 1994 y 1996, se comprobó la transmisión entre humanos y elefantes de *M. tuberculosis* en una granja de animales exóticos en el estado de Illinois, al constatarse mediante técnicas moleculares de tipificación que uno de los trabajadores, que contrajo tuberculosis activa, presentaba la misma cepa que cuatro de los elefantes, y que la mitad de los trabajadores dieron positivo a la prueba de la tuberculina (20).

Como se dijo, en cuanto a los animales salvajes más cercanos, es necesario tener en cuenta, al realizar investigaciones epidemiológicas, estos reservorios potenciales de infección, que podrían explicar algunos casos de persistencia de infección de *M. bovis* en el ganado vacuno. En el medio natural, los bóvidos y los cérvidos son los principales hospedadores de *M. bovis*, así como el tejón en Gran Bretaña y la zarigüeya en Nueva Zelanda, y de manera suplementaria algunos carnívoros como el zorro o el linco, y, sobre todo, el jabalí. Ya desde 1971, se viene diagnosticando presencia de *M. bovis* en tejones en Inglaterra, sugiriéndose su carácter de endémico en el Suroeste inglés, y que podría ser una importante fuente de infección para el ganado vacuno, con el que comparte hábitat (2). Hutchings y Harris, en 1997, demostraron que el tejón infectado contaminaba el pasto con micobacterias a través de las deyecciones, lo que supone una importante vía de infección para rebaños vacunos exentos de la enfermedad explotados en régimen extensivo (21). Cousins DV (2001) abunda en esta idea del papel epidemiológico de los animales salvajes en el sostenimiento del nivel de infectados, concluyendo que este elevado número de hospedadores domésticos y salvajes puede complicar los intentos de controlar o erradicar la enfermedad en el ganado vacuno (22).

En España, y concretamente en Extremadura, la tuberculosis viene siendo un problema desde hace tiempo en animales salvajes de aptitud cinegética, que se ha incrementado en los últimos años, especialmente en cérvidos. En jabalíes hubo un fuerte incremento a partir de 1995, manteniéndose más o menos estable desde entonces (23). En la fauna salvaje ibérica, está demostrada la sensibilidad de ciervos, suinos y caprinos a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*, y de bovinos a *M. bovis* y *M. avium* (24) En general son reservorios de la enfermedad personas y animales enfermos y portadores. Especial interés sanitario tiene el hecho de haberse aislado *M. tuberculosis* de ciervos y jabalíes, y de causar enfermedad tuberculosa en el perro y en el gato (25), lo que convierte a todos estos animales en reservorios susceptibles de contagiar al hombre.

En el caso de infecciones por *M. bovis*, los perros de rehalas, usados en cacerías de animales salvajes, pueden servir de reservorios del bacilo, con eventual transmisión posterior a otros animales salvajes, domésticos, o al hombre. Por un camino inverso, los perros se infectarían con *M. tuberculosis* a partir de sus cuidadores afectados, y diseminan la



(14) enfermedad por el ecosistema, en especial mediante el forcejeo con las piezas que luego escapan, lo que bien podría explicar las citas de presencia de *M. tuberculosis* en ciervos y jabalíes (24). Como factores epidemiológicos primarios, la infectividad (capacidad para transmitirse) y la invasividad (capacidad para difundirse por los tejidos del infectado), pueden verse incrementadas con la introducción de nuevas especies de aptitud cinegética en los ecosistemas, rompiendo la patobiocenosis. Como factores epidemiológicos secundarios, la sobrecarga ganadera y animal en general, acarrea una disminución de la fitobiomasa, lo que obliga a las especies salvajes a desplazamientos más o menos largos en busca de comida, favoreciendo la aparición y difusión de enfermedades micobacterianas; esto sería especialmente importante en zonas indemnes. Es el caso de desplazamientos de ciervos y jabalíes, así como aves salvajes, sirviendo de nexo entre ecosistemas diferentes, en los que pueden estar incluidos animales domésticos y hombres (26). También es importante el desplazamiento de rehalas de perros, que pueden ser portadores de especies o cepas nuevas en territorios indemnes, y que pueden causar la enfermedad tuberculosa, o exacerbar el proceso en el caso de reinfecciones, o, por último, en humanos y animales valiosos que reciben tratamiento, podría originar la aparición de multidrogoresistencias (27). Por lo que respecta al jabalí, tradicionalmente se ha considerado, al igual que el cerdo doméstico, simplemente un “fondo de saco epidemiológico”, es decir, susceptible de padecer la enfermedad pero con una nula capacidad de diseminación. Recientemente, sin embargo, el concepto de la importancia epidemiológica del jabalí está cambiando, pasando a ser considerado un “amplificador” de la tuberculosis, ya que los jabalíes adquieren la enfermedad de un reservorio y la transmiten dentro de la población de jabalíes, lo que explica los considerables niveles de prevalencia existentes; es decir, que está pasando a ser considerado un “reservorio por desbordamiento” (“spill-over host”) (28).

Por último, *M. avium*, responsable de cuadros de tuberculosis principalmente en aves y cerdos, no tiene un papel importante en el ganado vacuno, que es bastante resistente al bacilo, creando más bien problemas de diagnóstico con la prueba de la tuberculina, al sensibilizar por inmunidad celular, y no existiendo transmisión de la infección por *M. avium* de bovino a bovino. En cuanto al cerdo, es el agente que produce mayor número de tuberculosis, seguido de *M. bovis* (aunque menos generalizadas que las causadas por *M. bovis*); sin embargo, esta relación se invierte cuando se controla la infección en los bovinos, según se ha comprobado en Europa y Estados Unidos (1). Por lo que respecta a la transmisión de *M. avium* entre el hombre y los animales, se ha encontrado una distribución de serotipos muy similar en el cerdo y en el hombre, con lo que se sugirió la infección del hombre por comer carne de cerdo infectado. Sin embargo, las muchas investigaciones realizadas no han podido apoyar esta hipótesis. Actualmente se acepta que, tanto los animales como los humanos, se infectan desde una fuente común, no existiendo pruebas de una infección cruzada (29). En un estudio reciente realizado en la República Checa, en el que se analizaron y tipificaron 738 cepas del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC), procedentes de animales, aves, humanos y medio ambiente, mediante la detección de la porción IS 901 de material genético por PCR, y en función de su virulencia o no para el pollo, se concluyó que IS901 estaba contenido en la práctica totalidad de cepas virulentas para el pollo, pero ninguna de las 152 cepas aisladas de humanos resultó serlo, incluyendo las 12 cepas que sí contenían IS901 (30). En otra investigación anterior realizada en Dinamarca, se caracterizaron un total de 141 cepas de MAC obtenidas en el año 1993, procedentes

del hombre, de animales y del suelo, mediante serotipificación por ELISA específico para la proteína 40 kDa, y por PCR específica del fragmento IS901. Se obtuvo una distribución de serotipos de MAC diferente en el hombre y los animales; además, se halló la presencia de los marcadores IS901 y p40 exclusivamente en las cepas animales; todo ello sugiere que la transmisión de *M. avium* de los animales al hombre y viceversa no es significativa en Dinamarca (31).

Por todo ello, podemos concluir que el complejo *M. avium* tiene una escasa importancia desde el punto de vista zoonótico.

B) Diagnóstico y tipificación

En los animales vivos no suele ser posible el diagnóstico clínico, puesto que en la mayor parte de los casos, las lesiones no son visibles ni abiertas al exterior; únicamente cuando la evolución es más grave y cursa con generalización y/o emaciación, o bien porque predominen las lesiones exudativas en órganos que comuniquen con el exterior (pulmón, intestino, etc.), se podría llegar a realizar un diagnóstico sintomático, previo descarte de otros procesos exudativos o purulentos, o que cursen con una clínica similar (2).

En los animales salvajes ocurre lo mismo, pero con el añadido de la inaccesibilidad y la dificultad de observación de los animales, lo cual hace aún menos practicable el diagnóstico clínico, de tal modo que hay que apoyarse más bien en los hallazgos de necropsia, y en los datos epidemiológicos de la zona (24).

(15)

En el caso de la tuberculosis humana, puesto que no hay signos clínicos, radiológicos o anatómo-patológicos reconocibles y definitivos que puedan usarse como medios fiables para distinguir la forma humana de la forma bovina, los procedimientos laboratoriales de aislamiento y tipificación del agente etiológico son necesarios para conseguir un diagnóstico de certeza, ya sea por cultivos microbiológicos tradicionales, o por técnicas moleculares (1,3,32,33).

Por lo que respecta al diagnóstico microbiológico tradicional, a partir de muestras patológicas obtenidas de animales vivos (biopsias, exudados, heces, orina, esputos, etc.), o de muertos, podemos distinguir entre la Baciloscopia, principalmente utilizando la tinción Ziehl-Nielsen en fresco, que permite observar bacilos alcohol-ácido resistentes y complementar un diagnóstico presuntivo clínico y/o lesional, pero que presenta una baja especificidad, y, por otra parte, el aislamiento tras cultivo en medios tradicionales sólidos o líquidos (Tharsis-modificado B82, Lowenstein-Jensen, Middlebrook, etc.) y posterior identificación. Estos cultivos tienen el inconveniente de suponer un proceso largo, ya que las micobacterias patógenas presentan un muy lento crecimiento (entre 2 y 4 semanas), razón por la que las muestras deben someterse a un proceso previo de descontaminación, para evitar que microorganismos contaminantes invadan la superficie de crecimiento. En cuanto a la identificación, ésta se realiza mediante un siempre lento y complejo estudio de caracteres microbiológicos y bioquímicos, basado en unos patrones seleccionados por Wayne y Kubica. Sin embargo, la identificación de una especie de *Mycobacteria* en una muestra problema tiene una especificidad absoluta (24).



Pero, puesto que en la infección tuberculosa predomina la respuesta inmune de base celular, frente a la producción de anticuerpos, el diagnóstico sistemático en animales vivos se realiza, bien por la intradermorreacción tuberculínica, o bien in vitro mediante la medición del interferón gamma:

En cuanto a la prueba tuberculínica, único método utilizado de modo generalizado en los programas de erradicación, supone un buen indicador de exposición a la micobacteria, tanto en personas como en animales, pero proporciona poca información en cuanto al estado de evolución de la enfermedad, además de que requiere esperar 72 horas para conocer el resultado, tiene problemas de especificidad por reacciones cruzadas, y, en el caso de animales con curso muy crónico y avanzado de tuberculosis, puede existir una anergia por agotamiento inmunitario, lo cual supone falsos negativos. Además, conforme avanzan los programas de erradicación, aumenta el n.º de reaccionantes tuberculín-positivos sin lesiones aparentes en la inspección post-mortem. Por todos estos inconvenientes, se ha intentado ensayar otras pruebas serológicas que complementen, más bien que sustituir, a las pruebas tuberculínicas (1). La más importante, ELISA para detección de anticuerpos, pero con resultados menos fiables, ya que en fases avanzadas de la enfermedad, con lesiones exudativas, la sensibilidad decae ostensiblemente, además de que son frecuentes las reacciones inmunitarias cruzadas (2). Coincidiendo en este punto, Rittaco et al. (34), con la prueba ELISA detectó IgG contra *M. bovis* en bovinos con tuberculosis activa, pero no en los de curso subclínico, concluyendo que es una prueba que se complementa bien con la intradermorreacción, pues los animales anérgicos, negativos a dicha prueba, tienen un nivel alto de anticuerpos circulantes, y, al ser detectados, se elimina un gran riesgo del rebaño, pues presentan una fuerte descarga antigénica. Los resultados obtenidos en humanos con *M. tuberculosis* son parecidos, concluyéndose que el ensayo ELISA puede ser útil para detectar enfermos de tuberculosis pulmonar no bacilífera, extrapulmonar e infantil (35). Se ha ensayado también el empleo de anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de *M. bovis*, principalmente el método de la inmunoperoxidasa con un anticuerpo monoclonal de origen murino producido frente al antígeno MPB70, pero con el inconveniente de no detectar por debajo de 10^5 u.f.c./ml (36). Se realizó un estudio para investigar si los anticuerpos anti-MPB70 podían usarse como indicador de la infección por *M. bovis*, por medio de un ensayo inmuno-enzimático basado en la Proteína G, y en base al hecho de que en la infección natural por *M. bovis*, la prueba dérmica con tuberculina derivada de proteína purificada bovina (PPD) es un potente inductor de formación de anticuerpos contra dicho antígeno, concluyéndose que la prueba de intradermorreacción con PPD y MPB70 seguida de la prueba de detección de anticuerpos anti-MPB70 es un indicador altamente específico de la infección natural de *M. bovis* (37). A similares conclusiones llegan otros autores, que consideran la técnica ELISA con anti-MPB70 como una opción complementaria para el diagnóstico de tuberculosis en cabras (38). Otra prueba similar, también de detección del mismo antígeno, es la de la peroxidasa con complejo avidina-biotina (ABC-P); se ha comparado con la técnica Ziehl-Nielsen en relación con la sensibilidad, concluyendo que la técnica ABC-P es más sensible que el método Ziehl-Nielsen, al ser capaz de detectar mayor número de animales positivos, utilizando material patógeno de animales enfermos de tuberculosis de las especies bovina y caprina (39).

En cuanto a la prueba del γ -interferón, desarrollada en Australia, sirve para medir *in vitro* la respuesta inmune mediada por células a la tuberculina PPD bovina, y está basada en la detección, mediante técnicas inmuno-enzimáticas, del γ -interferón que se origina por la incubación durante 24 horas de la sangre entera de bovino, en presencia de tuberculina. Este método resultó más sensible y específico que el ELISA para detectar IgG en el suero, y en un estudio realizado en Argentina, se vio que detectaba mejor que el ELISA los casos de animales con lesiones confinadas a los ganglios, ya que no poseían casi anticuerpos, mientras que los animales con lesiones diseminadas tenían título alto de anticuerpos y poca o ninguna producción de γ -interferón (40). En un estudio reciente se evaluó la eficacia de la prueba del γ -interferón en su aplicación en campañas de erradicación de la tuberculosis en rebaños de cabras. Resultó que el número de infecciones detectadas por dicha prueba era considerablemente mayor que el de aquéllas detectadas por la prueba de intradermorreacción con tuberculina, concluyéndose que, realizando análisis consecutivos con la prueba del γ -interferón y con la prueba de la tuberculina, y adoptando las oportunas medidas de separación de animales al nacer, se puede llegar a obtener un rebaño exento de tuberculosis a partir de una situación de elevada inmunorreactividad (41).

Por último, y coincidiendo también en los resultados, se ha comprobado la idoneidad de este último método para detectar en cabras la infección por *M. bovis*, en un estudio en el que se comparaba la prueba de la tuberculina dérmica, la prueba del γ -interferón, y dos pruebas ELISA con antígeno PPD, una de ellas usando suero obtenido en el mismo momento de la inyección de tuberculina (estándar), y otra utilizando el suero obtenido a los 15 días de la inoculación (anamnésica). La sensibilidad y especificidad resultaron altas en el caso de la prueba de la tuberculina (83.7% y 100%), y de la prueba del γ -interferón (83.7% y 96%), y de la prueba ELISA anamnésica (88.6% y 95.8%). Por el contrario, fueron comparativamente bajas en el caso de la ELISA estándar (54.9% y 88%). Sin embargo, los resultados de esta última prueba fueron positivos (100%) en un grupo de cabras con tuberculosis cavitaria. La conclusión es similar a la de Liébana et als., 1998 (41): una combinación de la prueba de la tuberculina y de la prueba del γ -interferón ofrece la máxima sensibilidad, 95.8% y también la más alta especificidad, 96%. No obstante, en base a la sensibilidad de las pruebas serológicas para detección de tuberculosis en cabras con lesiones graves, se sugiere que una combinación de la prueba de la tuberculina y de la ELISA anamnésica puede ser más útil como parte de una campaña de erradicación de tuberculosis caprina.

(17)

C) Epidemiología molecular

Partiendo de la necesidad de acudir a la epidemiología como medio de lucha contra las enfermedades, a través de su consideración como herramienta fundamental para investigar los medios y modos de difusión de las enfermedades transmisibles, tales como la que nos ocupa, se concluye que dicha investigación epidemiológica difícilmente puede llevarse a cabo sin un diagnóstico etiológico preciso, es decir, sin llegar a definir los morfotipos exactos de microorganismos causantes de la enfermedad en la población afectada, o sea, la tipificación, ya que de la gran variabilidad genética que presenta el agente etiológico se pueden obtener los datos más relevantes a la hora de establecer hipótesis de origen y transmisión, y, en definitiva, de explicar la epidemiología de la enfermedad en la población en cuestión.



Pero las limitaciones que presentan los métodos de tipificación anteriormente descritos, fundamentalmente basados en aspectos fenotípicos (culturales o antigénicos), ha permitido el desarrollo de técnicas de clasificación en base al genotipo microbiano o secuencia del ADN, las cuales minimizan los problemas derivados de la no tipabilidad de los aislamientos, la escasa reproducibilidad y, en algunos casos, la imposibilidad de establecer bases de datos fiables de clasificación de microorganismos, aunque estas características varían bastante entre las distintas técnicas moleculares de diagnóstico (42).

Partiendo de la definición de epidemiología de Thrusfield (1986): “el estudio de la enfermedad en una población, y los factores que determinan su concurrencia”, podemos definir la epidemiología molecular como la integración entre la aproximación epidemiológica convencional y el uso de marcadores moleculares aplicables a la diferenciación entre cepas o aislamientos (43), de tal modo que, únicamente al comparar los patrones genéticos de las cepas obtenidas de los individuos problema, es como podemos asegurar un contacto epidemiológico.

La forma de actuar en epidemiología molecular es, básicamente:

1.º Generar los patrones genéticos de una colección de microorganismos. 2.º Comparar el grado de similitud entre dichos patrones. 3.º Inferir, a partir de esa similitud, patrones de transmisión, asociando grupos de cepas con un mismo patrón molecular, que llamamos “cluster” (44). La idea es, pues, generar un patrón reproducible e informativo de una cepa, el cual puede ser introducido en una base de datos y comparado con otras cepas.

(18)

Existen actualmente dos principales líneas de aplicación:

- Una es el estudio de brotes infecciosos, donde la investigación de los pacientes intenta diferenciar qué individuos están involucrados en una cadena epidemiológica concreta, si es o no reciente, así como la extensión alcanzada. Así, dos individuos que alberguen cepas idénticas, se habrán contagiado entre ellos o se habrán expuesto a un foco común. Pero hay que tener en cuenta que un patrón puede desaparecer como consecuencia de la evolución genética; de hecho, los patrones genotípicos de las cepas del complejo *M. tuberculosis* pueden variar en el mismo individuo o entre individuos que albergan cepas emparentadas, debido, bien a la evolución del patrón, a nuevas infecciones, o a errores laboratoriales (45). Como ejemplo, respecto a la técnica RFLP, que describiremos más abajo, a pesar de haberse descrito la estabilidad de sus patrones, pequeños cambios pueden darse en un clon, lo cual es muy importante a la hora de analizar varios aislamientos diferentes del mismo individuo (46). Para pequeñas comunidades con escasa incidencia, bastará una técnica con moderado poder de discriminación para trazar el brote, mientras que grandes cadenas epidemiológicas con elevada incidencia, requerirán técnicas con un elevado poder de discriminación (47).
- La otra línea de aplicación de la epidemiología molecular es la de los estudios poblacionales, encaminados a determinar factores de riesgo para la transmisión. En este caso se combinan los datos moleculares del gran número de cepas obtenido con datos demográficos, clínicos, lesionales o temporales (48).

Las técnicas moleculares se han utilizado también para determinar la proporción de casos procedentes, bien de un brote reciente, o bien de una reactivación. El grado de agrupamiento de las cepas (“*clustering*”) (CI), está directamente relacionado con la cantidad de transmisiones recientes, y se define como la proporción entre las cepas agrupadas y el total de cepas estudiadas (49). En el caso de la población humana, debido a la baja incidencia de la tuberculosis, un CI del 30% es suficiente para considerar que la población de aislamientos que estamos estudiando en un determinado momento, es debida a una diseminación reciente.

Pero, además de conocer el estado de agrupación de las cepas, interesaría obtener información sobre la cadena de transmisión, es decir, la dirección de los contagios. Para ello se ha introducido el “Índice de transmisión” (IT), resultado de introducir factores patológicos; así, si dentro de un cluster analizamos los tipos de lesiones, encontraremos individuos con lesiones primarias contagio reciente, y otros con lesiones secundarias, generalizadas pacientes crónicos. El IT se define como la media del número total de casos atribuibles, directa o indirectamente, a un único caso que sirve como origen, y se calcula a partir del n° de casos fuente o primarios, del n.º de casos secundarios, y del grado de agrupación de las cepas (CI) (50).

El espectacular desarrollo de investigación y trabajos publicados a cerca de *M. tuberculosis* en lo que a epidemiología molecular de tuberculosis en la población humana se refiere, contrasta con el hasta hace poco pobre nivel de estudio en el caso de *M. bovis* y el ganado vacuno. Esto ha empezado a cambiar recientemente, ya que en algunos países se ha incluido el rastreo molecular en los extensos programas de control del movimiento del ganado y de sistemas de información geográfica, de tal modo que estos sistemas permiten rastrear con exactitud los brotes de tuberculosis, su origen y desarrollo, y la interferencia con reservorios salvajes, controlando mejor los programas de erradicación (51). Otro tanto se puede decir del estudio de las infecciones por *M. bovis* en humanos, con aplicación de nuevas técnicas moleculares y la utilización de la infraestructura de investigación ya aplicada en el caso de *M. tuberculosis*.

Revisemos brevemente las principales técnicas y métodos utilizados en los estudios de epidemiología molecular actuales y más recientes, así como sus implicaciones en la epidemiología de la tuberculosis animal y humana:

– Sondas moleculares: Son fragmentos de ácidos nucleicos cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de otra, específica de complejo, género o especie. En general tienen la ventaja de poder realizarse directamente sobre las muestras patológicas sin necesidad de cultivo previo, aunque con sensibilidad discutida. La más usada es la *Southern blot*; en ella, un fragmento de ADN con una determinada secuencia se puede identificar en una mezcla de fragmentos por electroforesis, hibridando con una sonda complementaria marcada radiactivamente, que se visualiza con autorradiografía.

– Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Es la principal de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos micobacterianos. Con ella se pueden conseguir amplificaciones de secuencias específicas de ADN, a partir de los oligonucleótidos deseados, los



iniciadores, a los que se van uniendo nucleótidos merced a la enzima polimerasa, hasta conseguir cadenas de longitud detectable. Se pueden detectar cantidades insignificantes de ADN, aunque requiere conocer perfectamente dicha secuencia y el nivel de fiabilidad depende de los iniciadores elegidos, permitiendo llegar a identificar como máximo la especie, aunque algún autor la considera útil para caracterizar incluso el biotipo (2). En un artículo publicado en el año 2003, Huard RC y col. (52) presentan un método de tipificación basado en el PCR para diferenciar las subespecies del Complejo *M. tuberculosis*, como fuente de enfermedad en el hombre y/o los animales, ante la inexistencia anterior de un protocolo simple que rápida y fácilmente permitiera diferenciar entre los diferentes subgrupos del Complejo. Basado en el PCR y los locus cromosómicos que distinguen regiones diferenciadas, defienden su fiabilidad, rapidez y facilidad de ponerlo en práctica, además de demostrar su utilidad para conseguir colecciones de micobacterias, y con aplicación tanto clínica como epidemiológica.

– Técnicas de “análisis de los fragmentos de restricción”: La primera fue la técnica REA (Restriction Endonuclease Analysis), desarrollada a mediados de los ochenta en Nueva Zelanda, que se basa en el reconocimiento por parte de las endonucleasas de secuencias específicas de ADN con simetría rotacional en la estructura de doble hélice, y posterior separación por electroforesis, pero presentaba el problema de su difícil interpretación por el elevado número de bandas obtenidas. Mucho más importante y más utilizada es la técnica **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism), que, junto con la técnica “**Spoligo-typing**”, es la principal técnica usada actualmente para tipificar, es decir, para sobrepasar el nivel de la especie, por lo que es de gran importancia en epidemiología. La RFLP está aceptada internacionalmente y se ha integrado en los estándares de control sanitario de muchos países, aplicándose en la tuberculosis tanto humana como animal, especialmente en humana, ya que se ha aplicado más a *M. tuberculosis* que a *M. bovis*, (debido al menor n.º de copias de algunos fragmentos de ADN en éste que en aquél), aunque en ambos se obtienen patrones con suficiente discriminación como para ser aplicados a la tipificación. En general, comprende la utilización de tres enzimas y un *Southern Blot* para detectar una o más secuencias mediante sondas desarrolladas previamente, hibridando dichas zonas tras la digestión enzimática. De tales secuencias las más utilizadas son: IS 1081, DR, PGRS, secuencias VNTR (Variable Number Tandem Repeat), pero, sobre todo, la secuencia **IS 6110**, que presenta un número variable de copias en las especies del Complejo CMTB, en un nº que oscila, en el caso de *M. tuberculosis*, entre 6 y 19, aunque se han encontrado cepas con escaso n.º de copias (53). En cuanto a *M. bovis*, la mayoría de autores afirman que posee de una a cinco copias, aunque se han encontrado hasta trece copias de aislamientos bovinos y de cinco a siete en caprinos obtenidos en España, por lo que se considera una técnica útil para tipificar cepas de *M. bovis* aisladas de vacuno y caprino en España (54).

– Spoligotyping: Se basa en el uso como marcador genético de los polimorfismos en la región de repetición directa locus **DR**, y se aplica tanto en la tipificación como en la identificación de organismos del Complejo CMTB. Primero se realiza un PCR con dos iniciadores complementarios, uno de ellos marcado con biotina. Sus productos contactan con una membrana con los espaciadores del locus DR, y se produce la hibridación. Luego se adiciona una enzima que se liga a los productos PCR marcados con biotina, con un líquido de detección que emite luz en presencia de dicha enzima, visualizándose luego mediante

autorradiografía. Posteriormente se analiza mediante un sistema computerizado, para poder establecer las relaciones filogenéticas entre cepas. Tiene la ventaja de ser específica para el Complejo CMTB, permitiendo además la diferenciación entre las especies que lo componen (55). Después de la publicación en 1998 (Cousins), de un protocolo internacionalmente aceptado para tipificar aislamientos de *M. bovis*, pasó a ser una técnica utilizada sobre todo como segunda línea de tipificación, tras haber sido comparada por diversos autores su capacidad de discriminar con la de la técnica RFLP con IS 6110, resultando similares. Así, Aranaz y col., 1996(25), compararon ambas técnicas con cepas aisladas de diversas especies salvajes, caprino y bovino, resultando de gran utilidad el spoligotyping para estudios epidemiológicos de *M. bovis*, especialmente para aquellas cepas con una sola copia de IS6110. También la consideran una técnica muy adecuada para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*. Al comprobar coincidencia de espoligotipos, sugieren la transmisión entre varias especies salvajes y el bovino en España. Recomiendan por fin, tipificar cepas inicialmente mediante spoligotyping, y posteriormente con RFLP de IS 6110, aplicado a las cepas incluidas en los espoligotipos más comunes.

No obstante, recientemente se ha convertido en la técnica directa de elección para tipificar cepas de *M. bovis* (o de *M. tuberculosis* con cepas que contengan una o dos copias de IS 6110), debido a que el RFLP, a pesar de estar estandarizado, requiere un cultivo previo, más cantidad de ADN, más tiempo y personal entrenado. Pero el spoligotyping también presenta desventajas: como el polimorfismo que ofrece se basa en la amplificación de un solo locus, con una limitada capacidad de discriminación, podemos encontrar espoligotipos semejantes en cepas sin ninguna relación epidemiológica, por lo que debería más bien emplearse cuando las cepas proceden de áreas muy definidas, cuando los perfiles son muy infrecuentes, o bien cuando se utilice acompañada de otras técnicas (55).

(21)

Coincidiendo bastante con todos estos aspectos, Barnes y col. (56) reconocen las dos principales ventajas del spoligotyping: una, la poca cantidad de ADN necesario, producto de muestras casi sin cultivar, y otra la posibilidad de expresar los resultados en formato digital, ideal para incorporar a las bases de datos de genotipos. Pero a la vez, afirma el menor poder para discriminar entre cepas de *M. tuberculosis* que el que presenta la tipificación basada en IS 6110. Por su parte van der Zanden y col. (57), reconocen la aportación del spoligotyping a la epidemiología de la tuberculosis de la última década, pero afirman que el poder de discriminación no es óptimo. Para mejorarlo, introdujeron 51 nuevos oligonucleótidos espaciadores, mejorando los resultados al aumentar el n.º de patrones obtenido, recomendando la comercialización de esta membrana de spoligotyping de segunda generación para aquellos casos que requieran mayor discriminación, por ejemplo el estudio de cepas con bajo n.º de copias de IS 6110. Costello y col. (58) estudiaron en distintos animales domésticos y salvajes de Irlanda la capacidad de diferenciar cepas de *M. bovis*, comparando spoligotyping, RFLP de IS 6110 y PGRS (polymorphic GC-rich sequence), resultando esta última mejor que las otras dos. Comprobaron la comunidad de cepas entre el vacuno, el ciervo y el tejón, concluyendo que la transmisión entre estas especies ha de ser tenida en cuenta en la epidemiología de la tuberculosis en Irlanda.

4. DISCUSIÓN

Como hemos visto, *M. bovis* tiene un muy amplio rango de hospedadores a los que ocasionalmente puede infectar, (además del vacuno, que es su hospedador principal), incluido el hombre. En el caso de *M. tuberculosis* y de *M. africanum*, al ser mucho más específicos para el hombre, los animales, como el medio ambiente, juegan más bien un papel secundario como reservorios donde puede perdurar el microorganismo, debido a la resistencia de éste a condiciones extrañas a su hábitat natural, y donde principalmente en condiciones de excesiva carga microbiana o inmunodeficiencia del receptor, pueden causar una infección heteróloga poco frecuente, que, a su vez, puede reinfectar al hombre. Sin embargo, *M. bovis*, como hemos visto, tiene una epidemiología mucho más compleja, en la que los animales de abasto directamente, y algunos animales salvajes indirectamente, pueden causar tuberculosis en el hombre, con una clínica indistinguible de la producida por *M. tuberculosis*, por lo que, salvo que se realice un diagnóstico completo que llegue a determinar la especie del Complejo CMTB implicada, o al menos una consideración también de factores de riesgo no humanos a la hora de realizar el estudio epidemiológico del caso, se contabilizarán estos casos como de “tuberculosis humana”. Sabemos que proporcionalmente la incidencia de casos en humanos producidos por *M. bovis* es muy baja en los países occidentales, según las cifras oficiales. Sin embargo, el resurgimiento de la tuberculosis en el ganado vacuno en muchos de esos países, y en concreto en Gran Bretaña, está creando la preocupación de que la transmisión de la enfermedad del ganado a los humanos podría convertirse en un serio problema de salud pública; en consecuencia, es importante poder identificar con rapidez aquellas zonas donde las tasas de infección sean altas en estos animales de renta, ya que ello les convierte en un riesgo potencial de transmisión al hombre (13). Como se ha visto, disponemos de nuevas herramientas, a través de las técnicas de tipificación molecular, que pueden ayudarnos a reforzar nuestro conocimiento a cerca de la epidemiología de *M. bovis*, para lo cual deben incluirse en los programas de lucha contra tuberculosis del Sistema Nacional de Salud.

(23)

Por lo que respecta a la importancia desde el punto de vista cuantitativo de *M. bovis* como patógeno para el ser humano, la frecuencia de aislamientos en muestras clínicas es muy baja. En España, menos del 0.5% de las cepas aisladas de humanos tuberculosos son de esa especie. Pero la dificultad de discriminación de cepas dentro del Complejo CMTB puede ser la causa de la infradeclaración de los casos de infecciones por *M. bovis*, (59), habida cuenta de la ya citada dificultad de reconocerlas a nivel sintomático.



(24) Entrando en las aplicaciones de las descritas técnicas moleculares a la epidemiología de la tuberculosis, se puede decir que han supuesto una reorganización del Complejo CMTB, al considerar un nuevo subgrupo, dentro o no de *M. bovis*, según autores, que es el “*caprae*”. Ya en 1995, Gutiérrez y cols. (60) diferenciaron entre las cepas bovinas y las caprinas por el n.º de copias de la secuencia IS6110. Otros investigadores, también utilizando RFLP con IS6110, concluyen que en España las cepas de origen caprino forman un *cluster* perfectamente diferenciado de las de origen bovino (54). En 1999, Aranaz y cols. (61), tras caracterizar las cepas caprinas genética (RFLP y spoligotyping), y bioquímicamente, así como por la sensibilidad a la pirazinamida (hay práctica unanimidad en considerar *M. bovis* resistente y *M. bovis subsp. caprae* sensible, a la pirazinamida), concluyen que constituye un nuevo miembro del Complejo CMTB, y proponen la denominación de “*Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov*”, apuntando que puede jugar un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis animal y humana en España. Otros autores no comparten esta agrupación taxonómica, al defender la consideración de la variedad *caprae* como una subespecie dentro de *M. bovis*, ya que la única característica bioquímica que lo diferencia de aquél es la sensibilidad a la pirazinamida, no hallando tampoco justificaciones genéticas, por lo que consideran incorrecta la denominación de Aranaz 1999 (62). Lejos de converger en las opiniones, el mismo equipo de Aranaz y cols., en un reciente artículo, y basándose en los genotipos, insiste en la independencia de las cepas caprinas del *M. bovis*, proponiendo la elevación de subespecie a especie, dentro del Complejo CMTB. Apuntan, además, el hallazgo en otras especies (vacuno, oso salvaje y cerdo, además del hombre), y en otros países (Francia, Austria y Alemania) (63). Erler y cols. (64) han realizado un estudio mediante spoligotyping y RFLP de aislamientos de *M. bovis subsp. caprae*, último nombre internacionalmente aceptado, de vacuno, humanos y otros hospedadores de Europa central, comprobando la coincidencia de espiligotipos en individuos próximos geográficamente.

Gutiérrez y cols. (65) utilizaron la técnica del spoligotyping para tipificar 112 cepas procedentes de humanos y diversas especies animales (de ellas, 83 se aislaron de humanos), que incluían todos los aislamientos identificados como *M. bovis* por el Laboratorio Nacional de Referencia para Micobacterias de Majadahonda, entre enero de 1994 y noviembre de 1996; previamente, habían caracterizado por spoligotyping y RFLP con IS6110 18 cepas de origen bovino y 23 de caprino. El objetivo era evaluar la importancia del “genotipo caprino” como causante de tuberculosis en otras especies animales, incluido el hombre, o sea, valorar la importancia zoonótica de la tuberculosis caprina mediante la determinación de los tipos de cepas presentes en los aislamientos. Resultaron identificados con el genotipo caprino, además de tres aislamientos procedentes de cabras y dos de ovejas, tres de los 83 que causaron tuberculosis en humanos. Al investigar el origen de estas últimas, hallaron que uno de los pacientes era residente en un área rural donde son frecuentes las explotaciones caprinas, el segundo paciente trabajaba en un matadero, y el tercero era un veterinario con historial de contacto con rebaños de cabras afectados de tuberculosis. El patrón de este último caso era idéntico a aquél obtenido de los aislamientos de dichos rebaños. Concluyen que, aunque el ganado vacuno infectado constituye el principal riesgo de transmisión de *M. bovis* de los animales al hombre (como prueba el mayor n.º de aislamientos del genotipo bovino), bien sea por la mayor extensión de la enfermedad en dicha especie, o bien porque las cepas bovinas se adaptan mejor a hospedadores humanos,

los resultados obtenidos demuestran claramente que las cabras son también una fuente de infección para el hombre, lo cual implica que el riesgo zoonótico existe de hecho. Por último, aunque las tasas de tuberculosis en ovejas son muy bajas, el hallazgo de idéntico genotipo de *M. bovis* en cabras y en ovejas no excluye a estas últimas como posible fuente de infección, y recomiendan políticas de control y erradicación que limiten la extensión de la tuberculosis de la cabra a otras especies.

En la misma línea, en otro trabajo más reciente desarrollado en Alemania, se estudió la prevalencia de *M. bovis subsp. bovis* y de *M. bovis subsp. caprae* entre los casos de tuberculosis bovina en el periodo comprendido entre 1999 y 2001. Se trabajó con 166 aislamientos procedentes de humanos y 10 procedentes de animales, y se utilizó el método de spoligotyping y RFLP del gen *gyrB*. Los resultados fueron que 55 de los 176 aislamientos fueron identificados como *M. bovis subsp. caprae* (el 31%), y 121 (69%) se identificaron como *M. bovis subsp. bovis*. En general, se obtuvo una baja variabilidad de patrones-tipo (en nº de 59), con una tasa de clustering (CL) de 77% (19 clusters de 136 aislamientos). Sin embargo, esta distribución de genotipos, obtenidos en Alemania, difiere ampliamente de la de otras partes del mundo: así, el espoligotipo BCG no se ha encontrado ni en el Reino Unido ni en Irlanda, Australia, Canadá, ni apenas en Sudamérica. Esto indica que los países de Europa Occidental, como Alemania, Francia y España, parecen tener una caracterización muy similar de *M. bovis*, mientras que se encuentran genotipos diferentes en otras partes del mundo como Gran Bretaña o Australia. El conocimiento del genotipo predominante en una determinada región es, por lo tanto, de vital importancia a la hora de interpretar correctamente los resultados de la tipificación molecular en los casos de tuberculosis por *M. bovis*. Por último, si bien no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de casos por edad y sexo, sí encontraron marcadas diferencias en cuanto a la distribución geográfica, de tal modo que del tercio total de los casos de tuberculosis bovina en humanos que presentaban la variedad “*caprae*”, la mayor parte se dio en el sur de Alemania (33).

(25)

Por lo que respecta a los sistemas de investigación, notificación, registro y estadísticas oficiales de los casos de tuberculosis humana acaecidos en España, tenemos en primer lugar el **Sistema de Información Microbiológica (SIM)**, que es un subsistema de Vigilancia Epidemiológica, cuyo objetivo es complementar la información procedente del Sistema de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO), que recoge información de manera anónima sobre el paciente (datos personales y otros de relevancia epidemiológica), y sobre el microorganismo (tipo o subtipo, técnica empleada, etc.). Estudiando los datos que arroja este sistema referidos a los años 2000 y 2001, se observa que, de los aislamientos de micobacterias realizados, (un total de aislamientos de 2006 en el año 2000 y 1858 en 2001), tan sólo 1 de ellos correspondió a *M. africanum*, y únicamente 8 a *M. bovis*. Además de que la técnica diagnóstica principal (más del 99%) fue el aislamiento por cultivo, ya que sólo se notificó un caso por PCR, es claro que el universo muestral no es representativo del total de casos de tuberculosis en España, pues sólo representa 39 laboratorios de 12 CCAA (66). Por otra parte, analizando los datos procedentes del sistema EDO, se comprueba que también existe una infradeclaración, ya que, anteriormente a la publicación del R.D. 2210/1995, por el que se crea la **Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica**, sólo era obligatoria la notificación de las formas pulmonares de tuberculosis. A partir de entonces,



se incluyó además la meningitis tuberculosa, considerada como un buen indicador de la epidemia de tuberculosis en un país, pero no incluye el resto de formas extrapulmonares. La tasa de incidencia de tuberculosis respiratoria en el año 2000 fue, según esta fuente, de **19.64/100.000** habitantes, y la de meningitis tuberculosa fue de **0.24/100.000** habitantes, calculadas a partir de las declaraciones EDO y de forma complementaria con los aislamientos notificados al sistema SIM. Se mantiene, pues, la tendencia decreciente que se viene observando desde 1992, si bien continúa siendo el segundo país de Europa Occidental con más casos, según la **Red de Vigilancia Europea de Tuberculosis (Euro TB)** (67). La valoración de estos datos es que distan bastante de la realidad, por la infradeclaración en el caso del sistema EDO y por la limitada cobertura geográfica del sistema SIM. En apoyo de esta opinión, están los resultados de las tasas de incidencia reveladas por el **“Proyecto Multicéntrico de Investigación sobre Tuberculosis” (PMIT)**, impulsado por el Instituto de Salud Carlos III y las Direcciones Generales de Salud de las CCAA de Andalucía, Asturias, Castilla-La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Galicia, Murcia, La Rioja, País Vasco, Ceuta y Melilla, y entre cuyos objetivos, se encuentra el de mejorar el conocimiento de la incidencia de todas las formas de tuberculosis, y describir las características clínico-epidemiológicas de los casos. La tasa de incidencia de todas las formas de tuberculosis incluidas en el estudio, detectadas entre mayo de 1996 y abril de 1997, fue en el total del territorio, de **38.51/100.000** habitantes, lo cual confirma que la tuberculosis sigue siendo, a pesar de la tendencia descendente, un problema de salud pública de primera magnitud en España, agravado sin duda por la importante interacción entre la enfermedad y la infección por VIH (68). Las principales críticas que se le pueden hacer a este Proyecto (PMIT) son: que no aborda la identificación y tipificación de cepas, y que en los factores de riesgo que estudia, no está incluido ninguno de los relacionados con *M. bovis*, tales como contacto con animales, o consumo de alimentos sin higienizar.

(26)

También las tasas obtenidas por la Red Europea Euro TB, superan las de los datos oficiales EDO, aunque sin llegar a los niveles de PMIT; concretamente señalan una tasa de **21.2/100.000** habitantes para España, y 52.3 para Portugal. Pero siguiendo con el análisis de los datos EDO, nos encontramos que, de los 8270 casos de tuberculosis respiratoria del total nacional en el año 2000, que, como vemos, representa de por sí una cifra infravalorada, sólo en el 48% de los casos se tiene constancia de cultivo (único medio realizado como identificación, ya que la baciloscopia es, como se sabe, inespecífica y útil para confirmar sólo hasta el nivel del género *Mycobacteria*). En el caso de la meningitis tuberculosa, el porcentaje es aún menor, de los 125 casos del total nacional del año 2000, tan sólo en el 21.6% de los casos se tiene constancia de realización de cultivo. En ambos casos, se han obviado las técnicas moleculares, además de las formas extrapulmonares (67). Después de la inclusión de la meningitis, posterior al R.D. 2.210/1995, era necesaria la ampliación de la definición de caso de tuberculosis de declaración obligatoria a todos los tipos de la enfermedad, como ocurre en la actualidad, a partir de la decisión aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud de 26 de marzo de 2003 (69).

El n.º de casos declarados por España a la OMS correspondientes al año 2002 representó una incidencia global de tuberculosis de 18 casos/100.000 habitantes; en ese año, en el que, como se ha dicho, todavía se incluían sólo las formas respiratorias y meningíticas, las estimaciones de la OMS para España fueron de **30 casos/100.000** habitantes, señalando una tasa de detección de casos del 59% (70).

La necesidad de un diagnóstico certero, que llegue, como mínimo a nivel de especie, es importante también desde el punto de vista clínico, a la hora de aplicar el tratamiento más efectivo. Las terapias anti-tuberculosas no son las mismas según cuál es el miembro del Complejo CMTB que ha causado el proceso. Así, por ejemplo, *M. bovis* es resistente a la pirazinamida. Recientemente, está aumentando el n.º de casos producidos por *M. bovis* y *M. africanum*, debido, sobre todo, al aumento de casos de infecciones por VIH y SIDA, y a la llegada de población inmigrante, respectivamente. Aunque ahora mismo la práctica totalidad de aislamientos de *M. africanum* corresponde a población emigrante africana, lo más probable es que en pocos años se identifique en población autóctona española, con los consiguientes problemas de resistencias a fármacos (71). Esto se debe a que, como se ha comprobado, la mayoría de cepas resistentes se transmiten (47). Es por esto que, de acuerdo con Herrera y cols. (72), un diagnóstico diferencial a nivel de especie es importante porque implica la instauración de una adecuada pauta de tratamiento y un conocimiento de la epidemiología de la infección. Este equipo de investigadores del Laboratorio de Referencia de Micobacterias, Instituto de Salud Carlos III ha desarrollado un esquema de caracterización molecular, basado en PCR de diversos locus y RFLP, que permite identificar en un tiempo muy corto las especies del complejo tuberculoso con un 100% de sensibilidad y especificidad. Sería, por tanto de gran utilidad, tanto terapéutica como epidemiológica, que se incorporara esta u otras técnicas de similar operatividad y viabilidad a los protocolos asistenciales del Sistema Nacional de Salud.

Por último, en cuanto a la incidencia real de la tuberculosis en las especies bovina y caprina, por ser los animales de abasto más importantes desde el punto de vista zoonótico, en primer lugar por su mayor cercanía al hombre (factores zootécnicos), y en segundo lugar por su ya enunciada facilidad de transmisión al hombre (factores patológicos y epidemiológicos), veamos brevemente los datos oficiales referidos a la CA de la Región de Murcia, obtenidos de la Consejería de Agricultura y Agua (Dirección General de Ganadería), correspondientes a las campañas de lucha y erradicación de los años 1990 a 2003, aceptando la hipótesis razonable de que la distribución de incidencias no tiene por qué ser significativamente diferente a la del resto de España.

En el caso del ganado vacuno, como se puede ver claramente en la Tabla 2, el descenso ha sido continuo tanto en el caso del n.º de explotaciones afectadas (del 50.91% en 1990 al 2.80% en 2003), como, sobre todo, en el n.º de animales positivos a la intradermorreacción de tuberculina (del 10.51% en 1990 al 0.19% en 2003) (73). Estos datos coinciden plenamente con la línea marcada por casi todos los autores de descenso en la incidencia de tuberculosis en el ganado vacuno en las últimas décadas del pasado siglo, incluso hasta la erradicación en algunos países como Alemania, debido a estrictas y ambiciosas campañas de saneamiento ganadero (2,33,65), lo cual, como se dijo, ha supuesto una paralela disminución en la incidencia de tuberculosis bovina en la población humana de los países occidentales. Sin embargo, al menos en España, la enfermedad persiste en el vacuno, aunque sea con baja incidencia; además, esto siempre es debido a una fuerte y constante presión epidemiológica por las medidas incluidas en planes de lucha oficiales contra la enfermedad en esta especie. Por experiencia de otros países, se sabe que la relajación de estas medidas supone un resurgimiento de la enfermedad, como es el caso de Gran Bretaña (13).



En cuanto al ganado caprino, los datos son sensiblemente diferentes (Tabla 3). Coincidiendo con Gutiérrez y cols. (65), a diferencia del vacuno, no existen campañas de lucha tan generalizadas y organizadas como en aquél; además, la infección por *M. bovis* en el ganado caprino está muy extendida por todo el mundo, y sólo se adoptan mínimas medidas de control para evitar la extensión de la infección al ganado vacuno y al hombre. En el caso de la Región de Murcia, con un considerable censo de casi 100.000 cabezas, a pesar de que, desde hace unos pocos años, sí existe un programa oficial de lucha contra la tuberculosis caprina, podemos decir que supone un problema de sanidad animal de primer orden por las pérdidas que ocasiona, y, como hemos visto, con riesgo de convertirse en un problema de salud pública si no se toman las correspondientes medidas de control. Actualmente, el porcentaje de explotaciones afectadas supera el 20%, y el n.º de animales positivos a la prueba de la tuberculina ha ido acusando altibajos, pasando desde un 10.26% en 1990, hasta el 3.84% en 2002, con un repunte hasta el 7.75% en 2003 (73). A la luz de estos datos, vemos que estamos muy lejos de la erradicación, incluso del control, de la tuberculosis caprina en España, y por ello, no se puede estar de acuerdo con Acha, P. (1), cuando dice que la prevalencia en los caprinos parece ser baja, aunque sí reconoce un riesgo de transmisión al hombre por consumo de leche de cabras afectadas, pero no la transmisión directa al hombre por vía inhalatoria, hecho harto demostrado como hemos visto por medio de la epidemiología molecular (65).

Finalmente, y a modo de resumen, podemos establecer las siguientes conclusiones sobre la tuberculosis:

(28)

1. Se trata de una enfermedad cualitativa y cuantitativamente de grandísima importancia todavía en el mundo, especialmente en los países menos desarrollados, pero también en el mundo occidental, por la interacción de nuevas infecciones, especialmente el VIH, y por el efecto de las migraciones.

2. Es una enfermedad zoonótica, que se transmite de los animales al hombre y viceversa, y con una epidemiología compleja y cambiante, en la que los animales salvajes, los animales domésticos y el hombre, están interrelacionados, directa o indirectamente.

3. Por la extraordinaria variabilidad genética de las distintas especies del Complejo CMTB, el diagnóstico e identificación de aquéllas es importante, debido a la complejidad de su epidemiología. Además de las prolijas y lentas técnicas convencionales de aislamiento por cultivo e identificación bioquímica, existe una gran variedad de técnicas de reciente desarrollo, basadas en la biología molecular, de fiabilidad y operatividad variables, de gran interés epidemiológico, y que son el presente y el futuro de la lucha contra la tuberculosis, ya que permiten llegar a identificar las cepas y variedades.

4. Los sistemas de notificación oficial en España adolecen de falta de precisión en el diagnóstico etiológico, identificándose la especie de micobacteria en un porcentaje bajo del total de casos. Además, existe una clara infradeclaración. Por todo ello, está subestimada la incidencia y, por tanto, la importancia, de la tuberculosis zoonótica por *M. bovis*, y, posiblemente, también la infección por *M. africanum*. Sería, pues, deseable, que mejoraran los sistemas oficiales de notificación, y que se incorporaran procedimientos sencillos y precisos de técnicas moleculares a los estándares del sistema de salud.

5. Es importante monitorizar los casos de tuberculosis bovina en humanos, especialmente aquellos con alto riesgo de infección primaria, tales como ganaderos, empleados de mataderos, veterinarios, etc., e identificar cualquier transmisión entre animales y el hombre. Una combinación de PCR y RFLP para identificar especies, y de spoligotyping y VNTR para llegar a los genotipos y a las cepas, son herramientas muy útiles para discriminar y caracterizar molecularmente, tanto *M. bovis* como *M. tuberculosis*, salvando el problema de las pocas copias que presenta aquél del fragmento IS 6110. Posteriores mejoras en estas técnicas pueden extender este poder de discriminación a todo el Complejo CMTB.

6. Es evidente que la tuberculosis zoonótica, transmitida por las especies ganaderas, representa porcentualmente una mínima parte del total de casos en la población humana. No obstante, hemos de valorar este importante factor de riesgo, pues esa población de micobacterias son capaces de infectar al hombre, ante situaciones extraordinarias de inmunodeficiencias o de variaciones en los condicionantes ecológicos o medioambientales, que pueden modificar la epidemiología de la enfermedad.

7. Por último, hay que resaltar la importancia de una especie en dicha epidemiología, hasta ahora poco valorada y estudiada, como es la cabra, en primer lugar por haberse demostrado su transmisión directa o indirecta al hombre de la infección tuberculosa bovina, y porque puede estar ocupando el espacio epidemiológico que ha ido perdiendo el ganado vacuno, al disminuir en éste drásticamente los niveles de infección en las últimas décadas por la presión de las campañas de erradicación. En segundo lugar, por el considerable censo y la notable incidencia de la enfermedad entre los efectivos caprinos de determinadas regiones, lo cual supone un riesgo permanente para la población en contacto con los animales. La prueba de este riesgo zoonótico es el aislamiento mediante técnicas moleculares, y cada vez en mayor proporción, en la población humana afectada de *M. bovis*, de la subespecie "*caprae*", que se diferencia de la subespecie *bovis* porque ésta es resistente a la pirazinamida, mientras que aquélla es sensible a dicho fármaco.

TABLA 1

FRECUENCIA DE MYCOBACTERIUM BOVIS EN CASOS DE TUBERCULOSIS HUMANA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, DE 1954 A 1970

	Tuberculosis pleuropulmonar (Infección torácica primaria)			Tuberculosis. Otras localizaciones			Total de formas de tuberculosis		
	T	B	%B	T	B	%B	T	B	%B
Sudáfrica				180	13		180	13	7.2
Alemania	4,593	193	4.2	2,409	479	19.9	7,300(298 ²)	769	10.5
Inglaterra	2,000	4	0.2	4,739	64	4.2	12,676	305	2.4
Australia	26 ¹	6 ¹	23.1				26 ¹	6 ¹	23.1
Austria				898	5		898	5	0.6
Brasil	664	0	0	664	0		664	0	0
Congo				408	9		408	9	2.2
Dinamarca	1,967	70	3.5	107	13	12.2	2,074	83	4.0
Egipto	110	4	3.6	37	14	37.8	147	18	12.2
Francia	18,088	191	1.1	1,859	144	7.7	24,262	388	1.6
Grecia	583	11	1.9	16	3	18.7	599	14	2.3
Hungría				2,763	341		2,763	341	12.6
Irak	2,500	1	0.04				2,500	1	0.04
Italia	165	5		22	3	13.6	2,794	79	2.1
Kenia				57	0	0	57	0	0
Méjico				487	36		487	36	7.4
Nigeria				65	0	0	65	0	0
Polonia	385(68 ²)	6	1.5	59	34	57.6	603(187 ²)	48(1 ²)	8.0
Rumanía				27	7	25.9	27	7	25.9
Suiza	1 ²	1 ²		149	38	25.5	1,216(1 ²)	69(1 ²)	5.7
Checoslovaquia	1,149	44	3.8	275	101	36.7	1,424	145	10.2
Turquia	3,416	204	5.9	271	53	19.5	3,687	257	6.9
EEUU				2,000	2		2,000	2	0.1
Venezuela	1	1		165	9		165	9	5.4
Yugoslavia				16,000	3		16,000	3	0.01
TOTAL	35,648	741	2.1	10,092	953	9.4	83,022	2,607	3.1

T Número total de casos estudiado.

B Número de casos de tuberculosis de origen bovino.

%B Proporción de casos de origen bovino por cada 100 casos en los que se ha determinado la especie de bacilo.

1 Casos de tuberculosis observados en trabajadores de lácteos.

2 Casos de tuberculosis observados en personas en contacto con ganado. (8).

TABLA 2

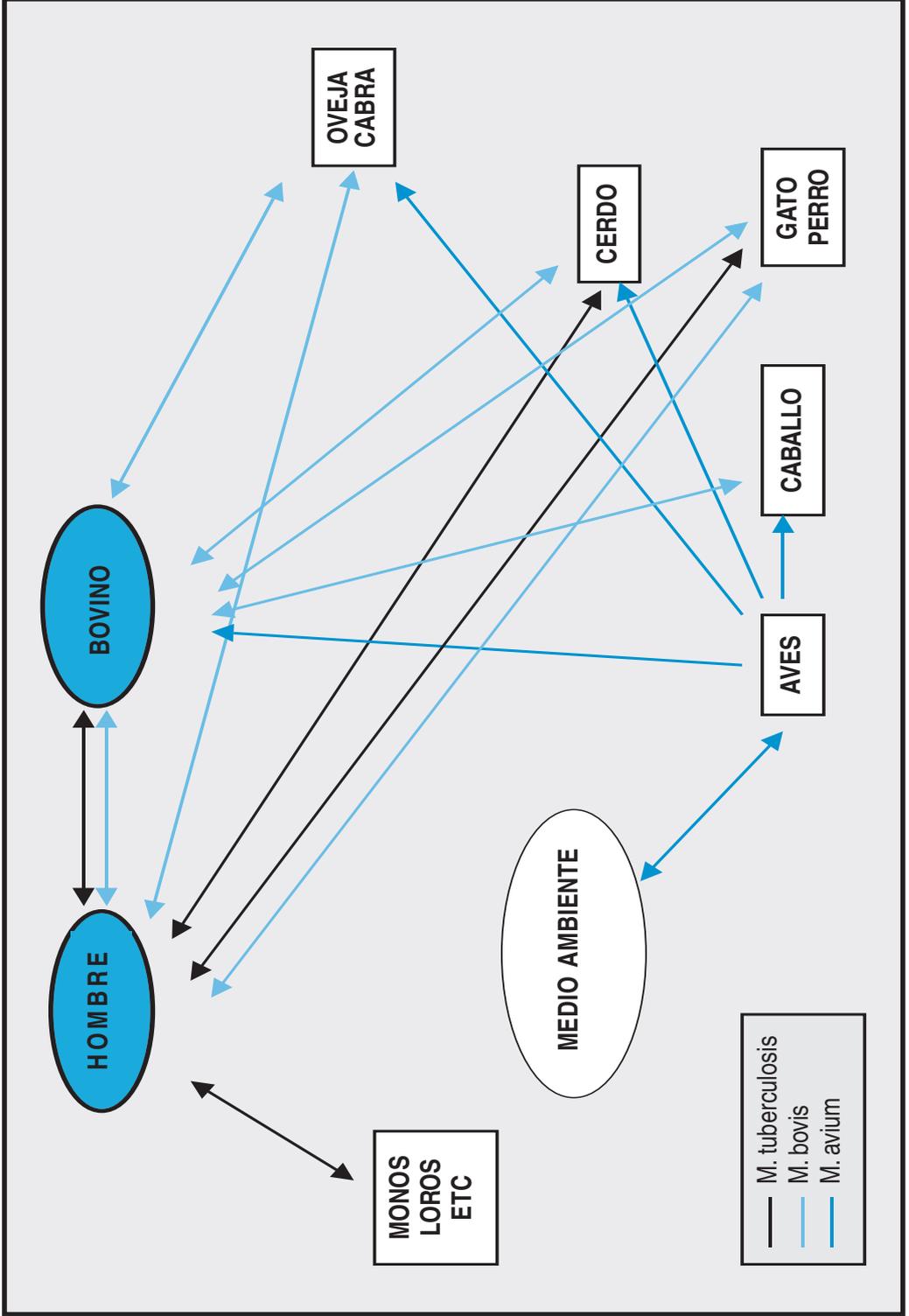
AÑO	N.º DE EXPLOTACIONES INVESTIGADAS	N.º DE EXPLOTACIONES POSITIVAS	% DE EXPLOTACIONES POSITIVAS	N.º DE ANIMALES INVESTIGADOS	N.º DE ANIMALES POSITIVOS	% N.º DE ANIMALES POSITIVOS
1990	273	139	50.91	8724	917	10.51
1991	327	126	38.50	9114	610	6.60
1992	219	63	28.76	7052	206	2.74
1993	172	30	17.40	6286	154	2.44
1994	132	14	10.60	4371	92	2.10
1995	159	30	18.90	7552	217	2.90
1996	175	34	19.43	9189	236	2.50
1997	167	22	13.20	10802	299	2.80
1998	225	11	4.89	8889	177	1.99
1999	121	9	7.44	8588	70	0.82
2000	116	14	12.07	8953	56	0.63
2001	122	11	9.02	10966	96	0.87
2002	126	6	4.76	10444	15	0.14
2003	107	3	2.80	9469	18	0.19

CAMPAÑA DE SANEAMIENTO DE TUBERCULOSIS EN GANADO VACUNO EN LA REGIÓN DE MURCIA (DISTRIBUCIÓN POR AÑOS (De 1990 a 2003) . (72))

TABLA 3

AÑO	N.º DE EXPLOTACIONES INVESTIGADAS	N.º DE EXPLOTACIONES POSITIVAS	% DE EXPLOTACIONES POSITIVAS	N.º DE ANIMALES INVESTIGADOS	N.º DE ANIMALES POSITIVOS	% N.º DE ANIMALES POSITIVOS
1990	85			9595	985	10.26
1991	229			23834	3968	16060
1992	211			21817	2341	10.70
1993	183			17169	468	2.72
1994	208			20408	850	4.16
1995	198			19251	884	4.59
1996	127			13909	556	2.68
1997	178			25032	1719	6.87
1998	183			30110	2228	7.40
1999	193			32162	1880	5.85
2000	201			32235	929	2.88
2001	255	46	18	45352	1042	2.30
2002	271	56	20.7	51610	1982	3.84
2003	355	77	21.7	73063	5660	7.75

CAMPAÑA DE SANEAMIENTO DE TUBERCULOSIS EN GANADO **CAPRINO** EN LA REGIÓN DE MURCIA (DISTRIBUCIÓN POR AÑOS (De 1990 a 2003) . (72))



5. BIBLIOGRAFÍA

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Vol.I 3.^a ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2003.
2. Martín P, León L. La tuberculosis: introducción a la enfermedad. *Galemys* 1998;10(2): 36-46.
3. Konyha LD, Himes EM, Thoen CO. Bovine tuberculosis. En: Steele JH Ed. Zoonoses. Section A Vol II. Boca-Ratón: CRC Press;1980. p.109-39.
4. Bernabé A, Navarro JA, Menchén V, Gómez MA, Sánchez J, Gómez S. Diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis caprinas. Infección natural simple y doble. En : Méndez A, Herrera M Eds. Producción y salud en pequeños rumiantes. Córdoba: Universidad de Córdoba; 1997. p.109-21.
5. Thoen CO, Karlson AG. The genus *Mycobacterium*. En: Packer RA, Mare CJ, Merchant IA Eds. *Veterinary Microbiology*. Ames: Iowa State University Press; 1980.
6. Myers JA, Steele JH. Bovine tuberculosis control in man and animals. Green WH. St. Louis; 1969.
7. Correa CNM, Correa WM. Human tuberculosis by bovine bacilli in Sao Paulo, Brazil. *Arq Inst Biol Sao Paulo* 1974;41(3):131.
8. Gervois M, Vaillant JM, Fontaine JF, Laroche G, Dubois G. Epidemiology of the human infection due to *Mycobacterium bovis*. *Arch Monaldi Tisiol Mal Appar Respir* 1972;27(3):294.
9. Feldman WH. Tuberculosis. En: Hull TG Ed. *Diseases Transmitted from Animals to Man*. Springfield: Charles C Thomas;1963.
10. Sjogren I, Sutherland I. Studies of tuberculosis in man in relation to infection in cattle. *Tubercle* 1974;56:113.
11. Meissner G. Bovine tuberculosis in man before and after the eradication of tuberculosis in cattle. *Prax Pneumol* 1974;28:123.
12. Blázquez J, Espinosa de los Monteros LE, Samper S, Martín C, Guerrero A, Cobo J et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:1390-1393.
13. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J et al. Molecular Epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2004;42:431-434.
14. Schliesser T. Tuberculosis in domestic and wild animals. *Prax Pneumol* 1974;28:511.



15. Snider WR, Cohen D, Reif JS, Stein SC, Prier JE. Tuberculosis in canine and feline populations. *Am Rev Respir Dis* 1971;104:866.
16. Schliesser T. Vorkommen und Bedeutung von Mykobakterien bei Tieren. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt* 1976;1:271.
17. Thoen CO, Richards WD, Jarnagin JL. *Mycobacteria* isolated from exotic animals. *J Am Vet Med Assoc* 1979;19:115.
18. Joubert L, Filleton R, Steghens P, Tissot J, Viallier J. Tuberculosis caused by bovine bacteria, a reversible zoonosis. *Rev Med Vet* 1973;36(6):757.
19. Oh P, Granich R, Scott J, Sun B, Joseph M, Stringfield C et al. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerg Infect Dis* 2002;8(11):1290-1293.
20. Michalak K, Austin C, Diesel S, Bacon MJ, Zimmerman P, Maslow JN. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerg Infect Dis* 1998;4(2):283-7.
21. Hutchings M, Harris S. Effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *Vet J* 1997;153:149-162.
22. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech* 2001;20(1):71-85.
23. Tato A, Hermoso M, Rey J, Alonso JM, Teixido J, García A. *Mycobacterium bovis* infections in wild and domestic animals in Cáceres province (Western Spain). *Rev Esp Quimioterap* 1997;10:182.
24. Tato Jiménez A. Infecciones por *Mycobacterium spp* en animales salvajes en la provincia de Cáceres. [Tesis doctoral]. Cáceres: Servicio de Publicaciones, Universidad de Extremadura; 1999.
25. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;34(11):2734-40.
26. León L. Principales enfermedades contagiosas en especies cinegéticas. En *Manual de Ordenación y Gestión Cinegética*. Badajoz: Ifeba; 1991.p.105-132.
27. Eisenach KD. Use of an insertion sequence for laboratory diagnosis and epidemiologic studies of tuberculosis. *Ann Emerg Med* 1994;24:450-453.
28. Parra Romero A. Epidemiología de la tuberculosis en artiodáctilos salvajes de Extremadura. [Tesis doctoral]. Cáceres: Servicio de Publicaciones, Universidad de Extremadura; 2003.
29. Thorel MF, Huchzermeyer H, Weiss R, Fontaine JJ. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res* 1997;28:439-447.
30. Pavlik I, Svastova P, Bartl J, Dvorska L, Rychlik I. 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* 2000;7(2):212-7.
31. Klausen J, Giese SB, Fursted K, Ahrens P. Distribution of serotypes, IS901 and a 40 kDa protein in *Mycobacterium avium* complex strains isolated from man and animals in Denmark. *APMIS* 1997;105(4):277-82.
32. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle Lung Dis* 1996;77:103-108.

33. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* caused one-third of human *Mycobacterium bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3070-7.
34. Ritacco V, Lopez B, Barrera L et al. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med* 1990;B 37:19-27.
35. Kantor IN de, Barrera L, Ritacco V, Miceli I. Utilidad del enzimoimmunoensayo en el diagnóstico de la tuberculosis. *Bol Oficina Sanit Panam* 1991;110:461-470.
36. Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR et al. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody. *Vet Microbiol* 1988;18:191-196.
37. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, Garcia MM, Dukes TW, Brooks BW et al. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28(5):913-21.
38. Acosta B, Real F, Leon L, Deniz S, Ferrer O, Rosario I et al. ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Aust Vet J* 2000;78(6):423-4.
39. Gutiérrez MM, García JF. Comparison of Ziehl-Nielsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *J Comp Pathol* 1993;109(4):361-70.
40. Ritacco V, Lopez B, Kantor IN de et al. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 1991;50:365-367.
41. Liebana E, Aranaz A, Urquía JJ, Mateos A, Domínguez L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust Vet* 1998;76(1):50-3.
42. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-69.
43. van Belkum A, Verbrugh H. Molecular epidemiology: what the epidemiologist needs to know. *Curr Op Infect Dis* 1997;10:296-303.
44. Hugh S, Behr MA Rhee JT, Small PM. Genetic distances for the study of infectious diseases epidemiology. *Am J Epidemiol* 2000;151:324-334.
45. Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD et al. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution or laboratory error?. *J Infect Dis* 2004;190(6):1158-66.
46. Szewzyk R, Svenson SB, Hoffner SE, Bölske G, Wahlström H, Englund L. Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in humans and animals in Sweden. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3183-85.
47. van Helden P. Molecular epidemiology: human tuberculosis. In Ratledge C, Dale J eds. *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. London: Blacwell Science;1999. p.110-122.
48. Borgdorff MW, Nagelkerke N, van Soolingen D, de Haas PE, Veen J, van Embden JD. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* 1998;147:187-195.
49. Alland D, Kalkut GE, Moss AR. Transmission of tuberculosis in New York city. An analysis of DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994;330:1710-16.



50. van Soolingen D, de Haas PE, Kremer K. Molecular epidemiology of tuberculosis in a low incidence country: a nation-wide study on transmission of tuberculosis between immigrants and the native population in the Netherlands. Utrecht: Utrecht State University;1996.
51. Skuce RA, Neill SD. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis* 2001;81:169-75.
52. Huard RC, de Oliveira LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1637-50.
53. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1987-95.
54. Liebana E, Aranaz A, Domínguez L, Mateos A, González-Llamazares O, Rodríguez-Ferri EF et al. The insertion element IS 6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet Microbiol* 1997;54(3-4):223-33.
55. Goguet YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2210-14.
56. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003;349(12):1149-56.
57. Van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4628-39.
58. Costello E, O'Grady D, Flynn O, O'Brien R, Rogers M, Quigley F et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3217-22.
59. Collins CH, Grange JM. Zoonotic implication of *Mycobacterium bovis* infection. *Irish Vet J* 1987;41:363-366.
60. Gutierrez M, Samper S, Gavigan JA, Garcia JF, Martin C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):2953-6.
61. Aranaz A, Liebana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A et al. *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* 1999;49 Pt 3:1263-73.
62. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. 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* 2002;52(Pt 2):433-6.
63. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. 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* 2003;53(Pt 6):1785-9.

64. Erler W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis subsp. caprae* isolates from central Europe. *J Clin Microbiol* 2004;42(5):2234-8.
65. Gutiérrez M, Samper S, Jiménez MS, van Embden JD, Marin JF, Martin C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997;35(12):3328-30.
66. Rodríguez Valín E. Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* notificados al Sistema de Información Microbiológica (SIM) en los años 2000 y 2001. *Bol Epidemiol Semanal* 2002;10(19):197-200.
67. Rodríguez Valín E. Situación actual de la tuberculosis en España: Incidencia y mortalidad desde 1995. Características de los casos de tuberculosis y meningitis tuberculosa declarados en 2000. *Bol Epidemiol Semanal* 2001;9(28):293-96.
68. Díez M, Grupo de Trabajo del PMIT. El Proyecto Multicéntrico de Investigación sobre Tuberculosis (PMIT). *Bol Epidemiol Semanal* 2000;8(12):121-24.
69. Ampliación de la definición de caso de tuberculosis en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (I). [editorial] *Bol Epidemiol Semanal* 2003;11(16):181-84.
70. Vigilancia Mundial de la Tuberculosis: Progresos hacia la consecución de los objetivos previstos para 2005 (OMS). *Bol Epidemiol Semanal* 2004;12(3):25-27.
71. Pérez Ybarra R. La identificación de cepas es clave en la terapia de la tuberculosis. *DIARIO MÉDICO* 2004 jul 8; Infecciosas:p. 16.
72. Herrera L, Saíz P, Valverde A, Molina T, Jiménez MS. Aplicación de métodos moleculares para la diferenciación de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En: XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(Supl 1):195-6.
73. Dirección General de Ganadería. Consejería de Agricultura y Agua. Región de Murcia. Datos de las campañas oficiales de saneamiento de tuberculosis vacuna y caprino. [no publicado].



Región de Murcia
Consejería de Sanidad

Dirección General de Salud Pública
Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis