

LA TUBERCULOSIS EN MAMÍFEROS: ZOONOSIS

Ángel Tato Jiménez, Veterinario Titular

Doctor en Veterinaria

SOCIVESC

Las micobacterias patógenas y especialmente las tuberculosas, se han adaptado a los animales mediante mutaciones, que les permiten sobrevivir en distintas especies, en las cuales pueden mostrar una virulencia distinta a la expresada en la especie humana. Todos los miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex (CMTB) provienen de un antecesor común hace entre 20000 y 35000 años (Brosch *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005). Así *M. microti* se ha adaptado a ratones y gatos (Smith *et al.*, 2009); *M. mungi* se ha adaptado a la mangosta anillada (Alexander *et al.*, 2010); el bacilo de Dassie y *M. orygis*, a los damanes, (Mostowy *et al.*, 2004); *Mycobacterium pinnipedii* en leones marinos (Cousins *et al.*, 2003), o *M. bovis* en vacas, ciervos y tejones, sudos, etc (Michel *et al.*, 2003). Curiosamente la adaptación de *M. tuberculosis* a la especie humana, aunque frecuentemente aislado de otras especies (gorilas, elefantes, perros) conlleva una atenuación de su virulencia para las otras, como bovinos, mientras que *M. bovis* ha exaltado su virulencia para vacas, conejos de indias y cabras (Dunn *et al.*, 1995; Nedeltchey *et al.*, 2009; Whelean *et al.*, 2010), afectando ocasionalmente a humanos inmunocompetentes (Benítez, 2015). En definitiva, la co-evolución de patógenos tan versátiles como las micobacterias del CMTB con huéspedes susceptibles en condiciones ambientales determinadas tiene un impacto duradero y poderoso en su adaptación a los mismos de forma beneficiosa para su supervivencia como especie.

Así, en estas especies, se registran progresivamente más hospedadores nuevos. Paralelamente se están observando en humanos y también en otras especies numerosos casos de TBC debidos a fenómenos de reactivación de focos silentes. Se sabe que el continuo contacto con micobacterias, puede modificar el estatus inmune del individuo, cambiando de un perfil TH1 (protector) a otro TH2. En muchos sentidos convendría valorar el papel de *M. bovis* e incluso de otras especies del CMTB sobre la especie humana, bien por la posible aparición en el próximo decenio de casos debidos a infecciones ocurridas en la actualidad; o bien por el posible “despertar” de TBCs “dormidas”, por contactos inmunológicamente activos, que podrían cambiar el perfil TH1 al TH2.

Miembros del complejo Tuberculosis:

Mycobacterium tuberculosis (Koch, 1882)

Mycobacterium canetti (van Soolingen, 1997)

Mycobacterium africanum (Castets, 1968)

Mycobacterium bovis (Lessel y Karlson, 1970)

Mycobacterium bovis BCG (Calmette y Guérin, 1921)

Mycobacterium microti (Wells, 1937)

Mycobacterium caprae (Aranaz, 1999)

Dassie bacillus (Smith, 1960)

Mycobacterium pinnipidii (Cousins, 2003)

Mycobacterium mungi (Alexander, 2010)

Mycobacterium orygis (van Ingen, 2012)

Mycobacterium suricattae (Parsons et al., 2013)

Comparten por encima del 99% de homología de sus DNAs, conteniendo alrededor del 65% de contenido en G+C y la misma secuencia de la fracción 16S de su RNAr (Sreevatsan et al., 1997)

Mycobacterium tuberculosis sensu estricto (de aquí en adelante cuando digamos *M. tuberculosis* nos referiremos al *M. tuberculosis sensu* estricto, denominando a las demás micobacterias por su nombre taxonómico específico) afecta principalmente a primates, y es responsable de la mayoría de los casos de tuberculosis en humanos. Sin embargo, también ha sido encontrado en el ganado bovino (Prasad et al., 2005; Srivastava et al., 2008; Fetene et al., 2009) y caprino (Cadmus et al., 2009), en cerdos (Thoen, 1999; Mohamed et al., 2009), en gatos y perros (Clercx et al., 1992; Aranaz et al., 1996b; 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 (Montali et al., 2001; Alexander et al., 2002; Une y Mori, 2007).

M. bovis tiene el espectro mas amplio de especies susceptibles, afecta a vacas, búfalos, bisontes, cabra, oveja, cerdo, perro (Ellis et al., 2006; Shrikrishna et al., 2009), gatos (Aranaz et al., 1996b; Monies et al., 2000) caballos (Monreal et al., 2001); también afecta a zorros, ciervos, gamos, jabalíes, tejones, zarigüellas, lince, liebres, y primates no humanos, entre otros (Gallagher y Clifton-Hadley, 2000; O'Brien et al., 2002; Aranaz et al., 2004a; Corner, 2006; Ryan et al., 2006; Une y Mori, 2007). También afecta al hombre debido al carácter zoonótico de la enfermedad (Dankner et al., 1993; Cosivi et al., 1998; Michel et al., 2010).

M. caprae afecta a bovino, ovino y porcino en contacto estrecho con las cabras (Aranaz et al., 1996a; Aranaz et al., 1999; Duarte et al., 2008; Boniotti et al., 2009). 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; Prodinger et al., 2002; Kubica et al., 2003).

M. africanum, causante de infecciones en hombre y otros primates (Thorel, 1980), también ha sido aislado de algunos casos de tuberculosis en ganado vacuno (Rahim et al., 2007)

ZOANTROPONOSIS Y ANFIXENOSIS

Nos referimos en este apartado a la infección micobacteriana de animales a partir del hombre; aplicando el término de anfixenosis, cuando la infección puede correr en ambos sentidos (sabemos que los elefantes se contagian de personas, pero a la vez excretan *M. tuberculosis*, ya que contagian a jirafas; por lo que las personas de su entorno serían susceptibles de ser infectadas por ellos. Algo semejante puede suceder con los suidos, que son capaces (al menos algunos individuos, de excretar bacilos tuberculosos por vía fecal, sin mostrar lesiones macroscópicas.

La susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* varía significativamente entre las distintas especies de animales no humanos. El macaco rhesus y el macaco de cola de cerdo, son las especies más susceptibles (Ghodbane y Drancourt, 2013). Los elefantes también son muy susceptibles, así como hámsteres, cerdos y cobayas. Los cánidos, focas, tapires, rinocerontes, ratas y ratones muestran una susceptibilidad intermedia; y son bastante resistentes a la enfermedad bovinos, felinos, equinos, ungulados, conejos, aves y reptiles (Vogelnest et al., 2015).

En alguna ocasión la aparición de la enfermedad en animales de compañía es un reflejo de la enfermedad en la población humana que les rodea y ocasionalmente conlleva al diagnóstico de la enfermedad en sus dueños (Hawthorne y Lauder, 1962; Erwin et al., 2004)

En el caso concreto de los bovinos, hay que diferenciar (por la existencia de campañas de lucha contra la TBC bovina) entre infección por *M. tuberculosis*, que no es tan infrecuente en esta especie y enfermedad TBC debida a esta micobacteria (bien porque los bovinos son bastantes resistentes, o bien porque el desarrollo de la respuesta inmunitaria específica puede contener las micobacterias en el lugar de infección). Diferentes estudios ponen de manifiesto que la infección por *M. tuberculosis* solo causa el 1% de las TBC detectadas en bovinos (Pavlik et al., 2003; Ocepek et al., 2005; Cadmus et al., 2006; Une y Mori, 2007); si bien es cierto que las técnicas de diagnóstico utilizadas en muchas ocasiones, no permiten la correcta identificación micobacteriana (Ayele et al., 2004). Sin embargo en algunos países de África, como Argelia y Sudán las tuberculosis en bovinos debidas a *M. tuberculosis*, llegan al 6'2 y 7'4% respectivamente; en Etiopía, Fetene et al. (2009) aislaron *M. tuberculosis* en el 15'4% de las muestras investigadas. Lógicamente estos altos valores de infección y/o TBC bovina por *M. tuberculosis* se correlacionan directamente con la elevada prevalencia de TBC humana en el entorno (Dye, 2006; Dye et al., 2009). De hecho, Regassa et al., (2008) ya demostraron que la prevalencia de TBC en vacas debida a *M. tuberculosis* era tres veces

superior cuando el personal de la explotación presentaba una tuberculosis activa que cuando la infección era latente. En India, Prasad et al. (2005), pusieron en evidencia una infección del 30'8% en vacas, debida a *M. tuberculosis*. En China, también ha sido aislado este patógeno en explotaciones ganaderas, identificándose *M. tuberculosis* en un 15,8% (6/38) de los animales infectados (Chen et al., 2009). Romero et al (2011), informan de la infección por *M. tuberculosis*, en tres terneras de otras tantas granjas españolas. La investigación epidemiológica puso en evidencia el origen humano de la infección, por unos inmigrantes de países del este de Europa.

El estudio mediante biología molecular (espoligotipado y análisis de las repeticiones en tándem de múltiples *loci*) de estos aislamientos pone en evidencia la coincidencia de perfiles genéticos entre los aislamientos procedentes de estos animales y los más frecuentemente obtenidos entre la población humana de la zona. En Europa occidental existe constancia de la infección por *M. tuberculosis* en ganado bovino del Reino Unido, en la década de los años 50, donde se detectó la infección en un total de cinco explotaciones (Leslie, 1960).

M. tuberculosis también ha sido aislado e identificado como agente causal de la tuberculosis en otras especies animales: cabras en Nigeria (Cadmus et al., 2009) y los cerdos en Egipto, Bosnia, Noruega, Inglaterra, Alemania, Eslovaquia, Polonia (Pavlik et al., 2003; Mohamed et al., 2009).

Entre los factores que favorecen las condiciones de transmisión del hombre a los animales se encuentran la proximidad y la frecuencia de contacto entre ambos. Por lo tanto, la infección causada por *M. tuberculosis* ocurre con más frecuencia en animales que están en contacto directo con los humanos, siendo los animales que están en cautividad los que presentan un mayor riesgo de contagio (Vogelnest et al., 2015; Montali et al., 2001). Durante las últimas décadas se han descrito por todo el mundo bastantes casos de tuberculosis en elefantes de zoológicos o granjas exóticas, hallándose en todos los casos una fuente de infección humana (Michalak et al., 1998; Davis, 2001; Oh et al., 2002; Payeur et al., 2002; Lewerin et al., 2005).

La infección por *M. tuberculosis* también ha sido descrita en animales de compañía, especialmente en perros. En un estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores, *M. tuberculosis* fue aislado de un 75% de los perros con tuberculosis y en más de un 88% de los casos hubo un contacto con pacientes con una tuberculosis activa (Liu et al., 1980). También se ha detectado la presencia de *M. tuberculosis* en aves psitácidas (Schmidt et al., 2008); y en monos (Alfonso et al., 2004; Une y Mori, 2007).

Se ha descrito la transmisión interespecífica de *M. tuberculosis* en especies animales, como fue el caso de contagio entre elefantes y jirafas de un zoo de Suecia (Lewerin et al., 2005).

Aunque es un hallazgo poco común, también se ha descrito la infección tuberculosa en un mismo animal producida por dos especies del complejo *M. tuberculosis*. En un estudio de tuberculosis realizado en la India sobre una única explotación bovina observaron 52 animales infectados (92,8%). Mediante una PCR anidada identificaron los agentes etiológicos, aislando *M. bovis* en el 28,8% de las muestras, *M. tuberculosis* en el 30,8%, y ambas especies (infección mixta) en un 38,5% (Prasad et al., 2005).

ZOONOSIS

La transmisión de *M. bovis* puede ocurrir entre animales, de animales a humanos, de humanos a animales y raramente entre humanos.

M. bovis es causante del 2% de las TBCs humanas en el mundo (Müller et al., 2013). Otros autores elevan esta tasa hasta el 5-10% de media (Wilkins et al., 2008) en algunos países en vías de desarrollo, como Tanzania; con picos de incidencia de entre el 18 y el 30% (Cleaveland et al., 2007). De los pacientes expuestos a *M. bovis*, al igual que ocurre con *M. tuberculosis*, solo unos pocos desarrollarán la enfermedad, generalmente como resultado de una reactivación (Sunder et al., 2009). En humanos puede producir TBCs con cuadros clínico-lesionales indistinguibles de los debidos a *M. tuberculosis*.

En Europa esta infección es poco común, habiéndose notificado en 2013 únicamente 134 casos en toda la UE. La mayoría de los casos se registraron en Irlanda, Alemania, Reino Unido y España (EFSA y ECDC, 2015). Sin embargo, antes de la implantación de los programas de erradicación y de los controles en matadero y de la instauración del tratamiento térmico de la leche y productos lácteos, la prevalencia era del 30% (O'Reilly y Daborn, 1995). Fuera de la UE, los países con mayor prevalencia son Méjico, Uganda y Nigeria, con valores que oscilan del 5 al 13,8% (Perez-Lago et al., 2014b). Estas cifras pueden estar infraestimadas debido a que la enfermedad es clínica, radiológica e histopatológicamente indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*. En España entre 2004 y 2007, el laboratorio nacional de referencia registró 89 casos de TBC humana debida a *M. bovis* y 21 por *M. caprae*, que corresponden al 1.9% y 0.3% del total de TBCs humanas (debidas a Complejo *M. tuberculosis*) (Rodríguez et al., 2009). En Extremadura, la tesis Doctoral de José Manuel Benítez Medina (2015) ha puesto en evidencia la existencia de 5 casos de TBCs humanas debidas a *M. bovis*, cuyos espoligotipos coinciden con los encontrados en animales domésticos y salvajes de la región.

La ruta clásica de transmisión de *M. bovis* al hombre ha sido la digestiva, fundamentalmente a partir de productos lácteos crudos. También hay que destacar la inhalación de bacilos, a partir de aerosoles (Thoen y Barletta, 2006).

Hoy hay que considerar otros factores favorecedores de la primoinfección por *M. bovis* o de la reactivación de focos silentes, dependientes de la especie infectada, en este caso humano, cuales son los factores de disminución de la inmunidad, bien por enfermedad, bien por terapéuticas, bien por el declive asociado a la edad.

Se ha demostrado la transmisión humano/humano de *M. bovis*, así como infecciones nosocomiales caracterizadas por una importante multidrogorresistencia (Samper et al., 2007) y generalmente, aunque no siempre, relacionadas con afectados por SIDA, en los que produce elevada mortalidad (Blázquez et al., 1997; Evans et al., 2007; Guerrero et al., 1997; Samper et al., 1997, 2007). Guerrero et al. (2009) en su estudio llevado a cabo en España entre los años 2004-07, demuestran una letalidad del 9% (10 de 110 casos zoonóticos estudiados), todos ellos debidos a *M. bovis*.

En el estudio realizado por Rodríguez et al. en el año 2007, se puso de manifiesto que los casos humanos debidos a *M. bovis*, se concentraban en la población comprendida entre los 15 y 44 años y en los mayores de 65 años. Todo ello viene a indicar una elevada infectividad para los jóvenes, a la vez que presume la reactivación de TBCs silentes,

cuyas infecciones probablemente hayan estado relacionadas con la actividad profesional.

Esto también parece constatarlo Benítez (2015), que refiere una TBC ganglionar cervical en una niña de 9 años, de origen norteafricano, lo que hace presumible que el origen de la infección sea digestivo; mientras que el resto de los pacientes presentaron formas pulmonares de la enfermedad, con edades de entre 65 y 76 años y un cuarto de 36; este último era manipulador en matadero, otro refirió ser ganadero y en los otros dos no se podía establecer relación profesional con animales; en todo caso estos últimos cuatro casos, al menos, parecen debidos a reactivación de focos silentes. La presencia latente del bacilo tuberculoso puede evidenciarse no sólo en los macrófagos de los granulomas, sino también en las células fagocíticas no profesionales. De hecho *M. tuberculosis* se aísla de biopsias de pulmón con una apariencia normal (Fenhall et al., 2002; Benítez, 2015). La apoptosis permitirá la eliminación de la célula muerta y de la bacteria contenida en ella, sin apenas daño tisular. Por el contrario, la necrosis favorece el crecimiento y diseminación de *Mycobacterium* spp. exacerbando la inflamación y alterando el tejido circundante.

Entre 1920 y 2003 se confirmaron entre 17 y 50 casos de TBC humanas al año en el Reino Unido, debidas a *M. bovis*; lo que representa entre el 0'5 y el 1'5% de los casos de TBC humana diagnosticados. Esta proporción es muy similar a la del resto de países desarrollados.

En Reino Unido los casos zoonóticos de TBC se atribuyen a reactivaciones de infecciones latentes que tuvieron lugar antes de la implantación de la higienización de la leche, o a infecciones adquiridas en el extranjero. Desde 1990 solo se ha documentado un caso de TBC humana debida a *M. bovis*, relacionada con una fuente animal. Aunque aparentemente el riesgo zoonótico es bajo, médicos y responsables de Salud Pública advierten que debido al incremento de la TBC bovina, no puede considerarse esta enfermedad como superada y remarcan su condición de zoonosis; especialmente para la población de riesgo: consumidores de leche cruda, personal de granja y de mataderos (Rua Domenech, 2006).

Mycobacterium africanum línea 6 (L6) es un importante agente de TBC en el oeste de África, estimándose que origina mas del 40% de las TBCs pulmonares humanas (Boatema et al., 2016).

MECANISMOS MOLECULARES DE LA ADAPTACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE LAS MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO TUBERCULOSIS

A pesar del elevado número de casos de TBC en animales debidos a *M. bovis*, existen distintas evidencias que sugieren que esta micobacteria no exhibe la misma virulencia ni infectividad para los humanos que *M. tuberculosis*. Indudablemente *M. bovis* infecta a humanos, pero no produce en ellos, o al menos no es frecuente que produzca, una infección sostenible, con transmisión horizontal en esta especie animal; algo semejante ocurre con *M africanum* L6 y con *M. caprae*. Aún teniendo en cuenta la

elevada identidad genómica entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* son patentes las diferencias en cuanto al potencial patogénico y virulencia que presentan para distintas especies. Ello implica que las diferencias fenotípicas se deben a la distinta expresión de genes.

Entre los distintos miembros del complejo tuberculosis, existen diferencias genómicas, denominadas “Regiones de Diferencia” (RD), que consisten en deleciones y que pueden afectar a la patogenicidad intrínseca de la micobacteria y a la expresión de esa patogenicidad en las diferentes especies animales a las que infecte (Tsolaki et al., 2004; Garnier et al., 2003). Entre estas regiones de diferencia, los genes correspondientes a la Región de Diferencia 1 ejercen un control regulatorio sobre otros genes relacionados con la virulencia (Mahairas et al., 1996). En lo que respecta a *M. bovis*, las cepas aisladas en Argentina, Holanda, Reino Unido y España, incluyendo las de origen humano, muestran deleciones en las Regiones de Diferencia 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 12 y 13 (Forrellad et al., 2013).

El genoma de *M. tuberculosis complex* codifica mas de 200 proteínas reguladoras, entre las que se incluyen mas de 100 reguladores transcripcionales y 11 regulones, en *M. bovis*, mientras que en *M. tuberculosis* solo son 10 (Bretl et al., 2011; Cole et al., 1998). Estos moduladores de la transcripción están implicados en la variabilidad de la virulencia que expresan unas cepas frente a otras, y sus efectos regulatorios determinan o no el crecimiento de las distintas cepas en macrófagos, lo que se manifiesta por el incremento de la carga micobacteriana en estos (Parish et al., 2003b). Los Regulones son: PrrA/PrrB (Ewann et al., 2002), DevR (DosS-DosT/DosR) también conocido como DosR (Malhotra et al., 2004), SenX3/RegX3 (Parish et al., 2003a, 2003b), MprA/MprB (Zahrt et al., 2003), U/U/TcrA (Hayden & Clark-Curtiss, 2004), NarL/NarS (Parish et al., 2003), KdpE/KdpD (Parish et al., 2003), TrcS/TrcR (Haydel et al., 1999), MtrB/MtrA (Zahrt & Deretic, 2001), TcrY/TcrX (Parish et al., 2003) y el PhoPR (Ludwiczak et al., 2002; Zahrt & deretic, 2001).

Una de las bases moleculares que mas influye en la diferencia es la que determina la expresión del regulon PhoPR (Perez et al., 2001), cuyos productos determinan variaciones en la contagiosidad, virulencia y patogenia de las distintas especies de micobacterias para las distintas especies de hospedadores. Los genes regulados por el regulón PhoPR son claves en la síntesis de lípidos (Walters et al., 2006; Gonzalo-Asensio et al., 2006; Frigui et al., 2008; Chesne-Seck et al., 2008; Galagan et al., 2013). Del control ejercido por el PhoPR dependen muchos factores de virulencia: Lípido F, ESAT-6, poliaciltrehalosa (PAT) y diaciltrehalosas, sulfátidos y sulfolípidos (SL) (Walters et al., 2006; Gonzalo-Asensio et al., 2006; Galagan et al., 2013; Camacho et al., 2009; Passemar et al., 2014; Goya et al., 2011). El sistema PhoPR es un regulador transcripcional de genes involucrados en la síntesis de componentes de la pared celular de *M. tuberculosis complex*. El hecho de que el control de las rutas de biosíntesis se efectúe por un sistema de dos componentes, permite el control coordinado de aquella, según varíen las condiciones medioambientales.

Existen al menos tres SNPs (polimorfismo de nucleótido único) que afectan a los genes regulados por PhoPR en *M. africanum* y que no han podido ser demostradas en *M. tuberculosis* (Gonzalo Asensio et al, 2014).

ESAT-6 y CFP-10 son secretadas por el sistema de secreción ESX-1 del *M. tuberculosis*, el cual se encuentra codificado en la región “región de diferencia 1” de su cromosoma (Millington et al., 2011). Este sistema media la exportación de factores de virulencia que permiten modular la respuesta inmune innata del hospedador en las primeras etapas de la infección (Skjot et al., 2000), por lo que su presencia resulta crítica para la virulencia de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Es un sistema de secreción tipo VII que permite el transporte de proteínas en la célula infectada por CMTB (Brodin et al., 2006). La actividad secretora ESX-1 es controlada por la expresión transitoria del operon *espACD* (Fortune et al., 2005; MacGurn et al., 2010); éste consta de 5 genes y se expresa en el fagosoma macrofágico (Rohde et al., 2007). El producto de ESX-1 regula la transcripción para el factor EspR (Hunt et al., 2012); es decir el operon *espACD*, está implicado en la expresión del regulón PhoP (Walters et al., 2006; Frigui et al., 2008; Chesne-Seck, 2006; Galagan et al., 2013). No obstante hay que señalar que la expresión de esta proteína no es específica de CMTB, pues se ha detectado también en *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. flavescens* y *M. gastri* (Sorensen et al., 1995; Harboe et al. 1997). Al estar presente en tantas micobacterias patógenas y/o medioambientales, se dificulta su potencial uso como herramienta diagnóstica para TBC en mamíferos, aunque suele utilizarse en los tests IGRA, para diagnóstico de TBC latente.

M. bovis y *M. africanum* L6 son deficientes en el Regulón PhoPR, debido a una mutación en sus locus *phoP*; que originaron cambios en la síntesis y producción de lípidos y proteínas, que habrían atenuado la patogenicidad de estas micobacterias para humanos (González-Asensio et al., 2014). No obstante, se ha comprobado que una delección, en la Región de Diferencia 8, en *M. bovis* y en *M. africanum* L6 hace posible la restauración de la secreción de ESAT-6 por estas micobacterias, por una vía independiente del regulón PhoPR, aunque insuficiente para compensar la pérdida de virulencia de estas micobacterias para los humanos (González-Asensio et al., 2014).

La principal diferencia hallada entre las cepas de *M. tuberculosis* (L4) y de *M. africanum* (L6) radica en la disminución de la expresión del regulón DosR en L6 respecto a L4, que corresponden a la mutación de genes relacionados con el regulón DosR. El regulón DosR de *M. tuberculosis* es imprescindible para la adaptación micobacteriana a los ambientes pobres en oxígeno (Mehra et al., 2015; Voskuil et al., 2003; Galagan et al., 2013). Así DosR está superexpresado durante la hipoxia, al contrario que sucede en los ambientes con oxígeno suficiente (Mehra et al., 2015; Voskuil et al., 2003).

M. africanum podría tener una estrategia diferente, basada en la mutación de 5 de los 7 operones que permiten a esta micobacteria sobrevivir en el interior de los macrófagos (Gehre et al., 2013); mientras que el regulón DosR se expresaría a menor escala que en *M. tuberculosis*; esta menor dependencia del regulón DosR, permitiría a *M. africanum* una mejor adaptación a ambientes microaerófilos (Boatema et al., 2017). Así *M. tuberculosis* requiere condiciones de aerobiosis, mientras que los cambios genómicos en DosR del L6 permiten a *M. africanum* crecer en condiciones de microaerobiosis, lo que se traduce en un incremento de su capacidad para infectar y propagarse por tejidos extrapulmonares (Boatema et al., 2017).

Los componentes de la envoltura micobacteriana están implicados en los fenómenos de resistencia y virulencia. Las ceras, unidas a carbohidratos y rodeadas por una capa lipídica, constituyen un eficaz mecanismo de defensa de las micobacterias

frente al huésped (Goren et al., 1976; Daffe y Etienne, 1999). El sistema de transducción de señales de dos componentes consta de una Histidino-quinasa (HK), capaz de responder a estímulos medioambientales y un regulador de respuesta (RR), que es activado por la HKT. Por lo tanto, juegan un papel fundamental en la respuesta micobacteriana a los cambios medioambientales (Walters et al., 2006; Galan and Curtiss, 1989; Groisman et al., 1989, 97, 2001; Miller et al., 1989).

Los genes estructurales dependientes del regulón PhoP *pks2*, *papA1*, *mmpL8* y *Rv3822*, codifican respectivamente una poliketosa-sintetasa, una poliketosa-sintetasa unida a proteína, un transportador de lípidos y una proteína de secreción (Walters et al., 2006).

pks2 se induce cuando *M. tuberculosis* está endocitado en el macrófago y produce poliketosa sintetasa, indispensable para la síntesis de ácidos grasos cerámico e hidroxitiocerámico, metil malonil CoA (Sirakova et al., 2001). Esos ácidos grasos multiramificados son imprescindibles para la síntesis del sulfátido SL-1. Una deficiencia en el gen *pks2* se traduce en una incapacidad de *M. tuberculosis* para la síntesis de SL-1, aunque esto no parece afectar a la patogenicidad; por el contrario mutaciones en el gen *mmpL8* coinciden con atenuaciones del crecimiento, al menos ex vivo, de *M. tuberculosis* (Converse et al., 2003; Rousseau et al., 2003).

Los genes *corA*, *mgtE* y *ctpI* codifican proteínas transportadoras de Mg²⁺, que es necesario para el crecimiento de *M. tuberculosis* y por tanto un factor de virulencia (Walters et al., 2006). En todo caso estos genes no parecen sobreexpresarse cuando hay déficit de Mg²⁺; según Walters et al. (2006), el déficit de Mg²⁺ en el medio ambiente celular implicaría una dificultad para la producción de determinados componentes de la pared micobacteriana: sulfátidos, diaciltrehalosa y poliaciltrehalosa. *M. tuberculosis* en el interior del fagosoma es deficitario en Mg²⁺, pero un aporte extra de este induce un incremento de su virulencia (Buchmeier et al., 2000).

DIFERENCIAS GÉNICAS Y FENOTÍPICAS ENTRE *M. bovis* y *M. tuberculosis*

Para comprender la filogenia del Complejo *M. tuberculosis* hay que revisar diferentes estudios de biología molecular: deleciones en el cromosoma (secuencias polimórficas largas), SNPs, y la variabilidad en las repeticiones directas contenidas en el locus DR (“spoligotype”) (Brosch et al., 2002; Kamerbeek et al., 1997; Mostowy y Behr, 2005; Smith, 2003). Así se puede estudiar la diferencia entre una cepa virulenta y otra atenuada y se observan regiones de polimorfismo: por ejemplo, 16 regiones ausentes en *M. bovis* BCG, que representan un total de 61 ORFs (*Open Reading Frames*: secuencias de información genética que pueden ser utilizadas para codificar aminoácidos). Nueve de estas regiones están ausentes también en cepas virulentas de *M. bovis* (Brosch et al., 2002).

M. bovis tiene el rango de hospedadores mas amplio de entre los miembros del complejo tuberculosis, en tanto que *M. tuberculosis* es el principal agente etiológico de la TBC humana. La elevada homología genómica entre ambas micobacterias y la ausencia de genes especie-específicos para *M. bovis*, sugieren la existencia de fenómenos epigenéticos (Garnier et al., 2003).

La homología genómica a nivel de nucleótidos, entre ambas micobacterias, llega a ser del 99'95% (Garnier et al., 2003). Sin embargo existe una expresión diferencial en 258 genes, De ellos, 95 se expresan con mayor penetración fenotípica en *M. bovis*, respecto de *M. tuberculosis*; los 163 restantes lo hacen mas en *M. tuberculosis*. La principal diferencia fenotípica corresponde a la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo intermediario, proteínas que condicionan la aerobiosis, procesos que afectan a su pared celular y de las denominadas proteínas hipotéticas (Rehren et al., 2007); de entre estas últimas, es de destacar que en *M. bovis* hay un 20% para las que no se ha atribuido una función específica, mientras que la tasa de expresión de proteínas hipotéticas en *M. tuberculosis* es del 13'5% (Rehren et al., 2007). En *M. bovis* se expresan un mayor número de reguladores transcripcionales que en *M. tuberculosis*. Sin embargo se expresan 18 genes de la familia PE/PPE en *M. tuberculosis*, por solo 3 en *M. bovis* (Rehren et al., 2007; Rohde et al., 2007).

El genoma de *M. caprae*, es muy parecido al de *M. bovis*, excepto por la presencia de varias sustituciones de nucleótidos en el gen *gyrB*, que no están presentes en los demás miembros del complejo tuberculosis (Aranaz et al., 2003).

Determinadas características de los genomas, como las SNPs contribuyen al polimorfismo y por tanto a explicar las diferencias entre ambas micobacterias, pero no aclaran completamente la distinta expresión fenotípica. Muchos de esos genes diferenciales codifican para los patrones de reconocimiento de la micobacteria en cuestión (Banu et al., 2002).

En el regulón PhoPR de *M. bovis* existen tres mutaciones (genes *oxyR*, *pncA*, *gyrB*) (respecto de *M. tuberculosis*), que determinan su baja expresión en *M. bovis*, y que se traduce por la falta de algunos lípidos de la pared micobacterina (Walter et al., en 2006) y la menor secreción del antígeno ESAT-6 (González Asensio et al., en 2014). Por el contrario, seis genes relacionados con la secreción de ESAT-6 exhiben mayor expresión en *M. tuberculosis* que en *M. bovis*. (Mattow et al., 2003; Sorensen et al., 1995; Brodin et al., 2004)

Además del PhoPR, existen varios reguladores, como las proteínas asociadas a nucleótidos Lsr2 (Gordon et al., 2010) y EspR (Raghavan et al., 2008; Blasco et al., 2012) así como los otros 10 sistema de dos componentes TCSSs (Bretl et al., 2011); de los cuales solo el U/UTcrA está presente en *M. bovis* y no en *M. tuberculosis* (Bretl et al., 2011). En todo caso esta regulación podría diferir entre los diferentes miembros del complejo tuberculosis; sería el caso de *M. bovis*, puesto que la eliminación de la secuencia anterior a la región de activación del *espA* (EAR) se traduce en una menor expresión de este gen. En consecuencia la variación de la expresión de ESX-1 en las distintas micobacterias del complejo tuberculosis, contribuye a la diversidad de patologías causadas y al diferente espectro de hospedadores (Hunt et al., 2012). La regulación del sistema de secreción ESX-1, debida a distintos sustratos y productos génicos, como EspA implica que su actividad podría estar controlada por la expresión transitoria de genes *espACD*, los cuales se expresarían temporalmente en el fagosoma macrofágico.

Las cepas de *M. bovis* y las de *M. africanum* (L6) presentan una deleción de la región de diferencia 8 (RFD8) (Gordon et al., 1999), así como varios SNPs situados

inmediatamente delante del gen *espACD*, respecto del genoma de *M. tuberculosis*. Esta deleción en la Región de Diferencia 8 elimina los sitios de enlace para los productos EspR y MprAB y también podría afectar a la expresión del gen *espACD*. Los elevados niveles encontrados de la expresión de este gen en animales infectados por *M. bovis* o por L6, sugieren que la expresión del operon *espACD* no está sujeta al control del PhoPR en esas cepas (Gonzalo-Asensio et al. 2014), como ya apuntábamos anteriormente. De todo ello puede deducirse que determinadas mutaciones de los genes relacionados con el regulón PhoPR disminuyen la expresión de SL, PAT y Lípido F, moléculas implicadas en la de virulencia y que tanto *M. bovis* como *M. africanum* L6 tienen en menor proporción que *M. tuberculosis*. Sin embargo esas micobacterias pueden sufrir mutaciones que compensan su falta de virulencia para humanos; también en *M. tuberculosis* podrían existir mutaciones en el bucle de control de la expresión del gen *espACD*, que constituirían una alternativa a la falta de virulencia (Gonzalo-Asensio et al. 2014).

El sistema de regulación PhoPR es deficiente en las micobacterias adaptadas a animales (respecto de *M. tuberculosis*), debido a una mutación en el gen *phoR*. En el caso de la cepa L6 de *M. africanum*, la explicación de la disminución de virulencia, respecto a *M. tuberculosis*, radicaría en mutaciones del locus *phoPR* que habrían ocurrido en el antecesor común de *M. bovis* y *M. africanum*. Estas mutaciones afectarían a la síntesis y secreción de lípidos y proteínas y que supondrían una pérdida de capacidad patogénica para los humanos, aunque como se cita anteriormente una deleción en la región de diferencia 8 restablecería parcialmente su virulencia en humanos. Un lugar de elevada significación regulatoria, controlada por el regulón PhoP/R es el correspondiente a la región intergénica situada entre *rv2395* y *PE_PGRS41*, donde se encuentra el gen *mcr7*, que codifica un pequeño segmento de ARN no codificante (ncARN) (Solans et al., 2014). Este gen existe solo en las micobacterias del complejo tuberculosis, aunque solo se expresa a un nivel elevado en las cepas de alta virulencia de *M. tuberculosis* sensu stricto, caso de la H37rv; habiéndose detectado su presencia, pero sin expresión fenotípica en *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. microti*. Solans y cols (2014), utilizando técnicas proteómicas, ponen de manifiesto que este *mcr7* modula la acción del trasladador de proteínas *tatC*, sobre el ARNm (con lo que modula el sistema de secreción regulado por este transportador proteínico de doble arginina). El resultado es que el inmunógeno mayor complejo-Ag85 no se secreta, afectándose la beta-lactamasa C y permitiendo la secreción de ESAT-6. Todo ello permite relacionar el Sistema regulador de dos components PhoP/R con los consecuentes sucesos inmunopatológicos, que dan lugar a una infección existosa por parte de *M. tuberculosis*

El polimorfismo observado en el patrón de genes expresados, correspondientes a la pared micobacteriana está correlacionado con la secuencia de estos genes, conformando una importante fuente de variabilidad antigénica (Rehren et al., 2007). En todo caso la principal diferencia en el secretoma de ambas micobacterias es la elevada expresión en *M. bovis* de los dos antígenos mayores MPB70 y MPB83 (Hewinson et al., 1996). Tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis*, estos antígenos se expresan bajo el control del gen *sigK*; la elevada expresión de estas proteínas en *M. bovis* es consecuencia de una mutación en el gen que codifica para la proteína anti-SigK (Charlet et al., 2005; Said-Salim et al., 2006). El análisis del gen *mpb70* pone en evidencia la diferencia entre ambas micobacterias; también se observa una mayor expresión en *M. bovis* del gen

mpb83, así como de sus genes vecinos *dipZ* y *Mb2901*. Los genes ortólogos en *M. tuberculosis* han sido identificados como miembros de un operon putativo (Juárez et al., 2001). Ambos genes son miembros del regulon SigK-RskA (Said-Salim et al., 2006). Ahora bien, aunque la expresión de *mpb70* y *mpb83* es baja en *M. tuberculosis*, aumenta considerablemente con la infección de los macrófagos, lo que sugiere una importante función de estas proteínas (Schnappinger et al., 2003; Said-Salim et al., 2006).

También se han observado patrones de expresión distintos para los genes responsables del transporte específico de fosfatos, en sendas micobacterias, correspondiente a la expresión de la proteína periplasmática de unión a fosfatos. Existen dos proteínas formadoras de canales transmembrana (PstA and PstC) que probablemente interactúan con una proteína citoplasmática de unión de ATP (PstB). El clúster de genes que codifican para esas proteínas está constituido por tres operones: *pstS3 /pstC2 /pstA1*, *pstS2 /pknD* y *pstB /pstS1 /pstC1 /pstA2* (Torres et al., 2001; Lefevre et al., 1997). Rehren et al., en 2007, observan que hay una mayor expresión del operon *pstS1/ pstC1/ pstA2* en *M. tuberculosis*; mientras que los genes *pstS3/ pstC2/ pstA1* se expresan mas en *M. bovis*. Por contra, otro gen, el *pknD*, igualmente implicado en la regulación del transporte de fosfato, está altamente expresado en *M. tuberculosis*, siendo un pseudogen en *M. bovis*; lo cual implica la existencia de distintos mecanismos para la regulación del transporte del fosfato en sendas especies micobacterianas (Peirs et al., 2000).

Naturalmente también existen diferencias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* en cuanto a los genes implicados en la formación de lípidos constituyentes de la pared celular, lo cual tiene implicaciones en sus correspondientes virulencias, sobre todo cuando infectan a especies que no son sus hospedadores habituales. Así en *M. bovis* hay una mayor expresión de los genes *fadD26* y *ppsA-D*, que codifican para la ácido graso CoA ligasa y para la policetido-sintetasa, enzimas implicadas en la biosíntesis de los glicolípidos dimicocerosato de tiocerol (PDIM) y fenoltiocerol (PGLS) (Azad et al., 1997; Camacho et al., 2001). Estos PGLs no son producidos por todas las cepas de *M. tuberculosis*, lo cual se debe a cambios originados por mutaciones en el gen *pks1* (Cosntant et al., 2002). Sin embargo las cepas de *M. tuberculosis* que producen GPLs son de alta virulencia (Reed et al., 2002; Tsenova et al., 2005). Los genes *pks2* y *mmpL8* codifican una policetido sintetasa y un transportador de lípidos, respectivamente; ambos genes son precisos para la síntesis y el transporte de sulfolípidos 1 (SL-1) detectado exclusivamente en *M. tuberculosis* y que está implicado en las interacciones patógeno/huésped (Converse et al., 2003; Sirakova et al., 2001)

El gen *mce* codifica las proteínas MCE (proteínas de entrada en células de mamíferos). La proteína MCE1 confiere a la micobacteria la facultad de entrar y sobrevivir en macrófagos y células de mamíferos (Arruda et al., 1993). Los genes *mce* forman parte de operones que contienen 8 genes cada uno: dos genes *grbE*, seguidos por 6 genes *mce*; *M. tuberculosis* contiene 4 locus para *mce*: *mce1*, *mce2*, *mce3* y *mce4*; en *M. bovis* falta el *mc3* (Zumárraga et al., 1999). Santangelo et al., en 2008, demuestran el papel regulador ejercido sobre la transcripción por MCE3R, ya que no solo controla la expresión del operon que contiene el gen *mc3*, sino de otros genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos y en reacciones Redox.

En *M. tuberculosis* hay tres metaloproteasas zinc-dependientes. Por solo dos en *M. bovis* (Forrellad et al., 2013).

Los factores sigma sigB, sigE y sigH modifican la expresión de un subgrupo de genes necesarios para la adaptación al estrés *in vivo* (Manganelli et al., 2002). Existen cuatro genes sobreexpresados, en las fases anaeróbicas o hipóxicas (*narG*, *cysH*, *nirA* y *fdhF*) y otros cuya expresión cesa en condiciones aeróbicas. Podría deberse a que los regulones ejercen su función de manera independientes unos de otros, según el estado a que el medio ambiente induzca a la micobacteria (Hampshire et al., 1998). El principal factor sigma de micobacterias RpoV, es capaz de conferir virulencia a una cepa de *M. bovis* atenuada (Gómez et al., 1998). *M. tuberculosis* codifica para trece factores sigma, siendo el principal el SigA (Forrellad, 2013). El gen *sA* codifica la proteína SigA (RpoV), que además de sobreexpresarse en condiciones de estrés, actúa también como regulador genético transcripcional. El gen *whiB3* produce la proteína WhiB3, miembro de la familia de reguladores WhiB3; esta proteína se une a SigA, lo que sugiere una concertación del control transcripcional, ejercido por ambos reguladores (Steyn, 2002). Lo hacen controlando la expresión de los genes *pk2*, *pk3* y *f6pA*, involucrados en la síntesis de lípidos multiramificados (que favorecen la supervivencia de las micobacterias en el interior de los macrófagos humanos). Normalmente *M. bovis* no produce tantos lípidos de este tipo como *M. tuberculosis*, por lo que la acción del regulón WhiB3 resulta esencial en la supervivencia de esta micobacteria en macrófagos de la especie humana.

De especial interés son los reguladores de la transcripción, que permiten la adaptación de la micobacteria a los distintos ambientes, mediante la regulación de la transcripción de un grupo de genes determinado. Así *M. tuberculosis* sobreexpresa los genes *rv2160c* y *rv0232*, los cuales codifican el regulador transcripcional de la familia TetR/AcrR. Sin embargo en *M. bovis* se sobreexpresan 7 genes, entre ellos el *whiB6* (que tiene una penetración fenotípica de 30'5 veces, respecto a *M. tuberculosis*) (Rehen et al., 2007). Así mismo los otros miembros de la familia génica *whiB*, los *whiB3* y *whiB4* tienen una expresión en *M. bovis* de 2'7 y 2'9 veces mayor que en *M. tuberculosis*; por contra el *whoB1* penetra 2'6 veces mas en *M. tuberculosis* que en *M. bovis* (Rehnen et al., 2007). Estos autores afirman que esta regulación diferencial contribuiría a la expresión de los diferentes fenotipos observados en sendas micobacterias.

Las deleciones genómicas detectadas en una micobacteria respecto de la otra, corresponderían a la diferente evolución que han sufrido los distintos miembros del complejo tuberculosis (Gordon et al., 1999; Brosch et al., 2002). Rehnen et al., (2007), detectan en *M. tuberculosis* la expresión de 31 genes, que asientan en las RDs 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13, pero para los cuales existe deleción en el genoma de *M. bovis*. Esos genes serían responsables de distintos factores de virulencia y por lo tanto responsables del fenotipo; entre ellos están los reponsables de la fosfolipasa C, profagos, relacionados con ESAT-6 y de la familia de proteínas PE. Por contra, en *M. bovis* se detectan 5 genes en la región RvD que codifican para un transportador transmembrana de proteínas, dos proteínas y un cofactor-dependiente de molibdeno para la síntesis de proteína, así como un regulador transcripcional (Rehnen et al., 2007). Hay dos deleciones funcionales para todos los miembros del complejo tuberculosis; así la deleción de RD1 juega un papel en la atenuación de *M. bovis* BCG (Pym et al., 2002).

La evolución ha permitido, en base a posteriores mutaciones adicionales, la aparición de otras especies micobacterianas del complejo tuberculosis, que afectan a distintos animales (Smith et al., 2009). También se ha aislado en humanos una cepa B de

M. bovis, que resulta altamente patógena para nuestra especie. Esto es debido a la presencia de un elemento móvil insertado por delante del locus *phoPR*, lo que determina la sobreexpresión de este y se traduce en su transmisión por aerosoles entre humanos con el consecuente desarrollo de TBC pulmonar activa en los individuos de esta especie (Rivero et al., 2001; González-Asensio et al., 2014). Este factor de virulencia en *M. bovis* para la especie humana, lo constituye el elemento de inserción 6110 (IS6110), dependiendo del nº de copias de este elemento presentes en el genoma de *M. bovis* (Benítez, 2015). Esto se ha observado en condiciones de campo con un brote de TBC humana debido a *M. bovis* en España (Buchmeier et al., 2000; Gonzalo-Asensio et al., 2014). La presencia del segmento de inserción 6110 en *M. bovis*, determina un incremento de la virulencia de esta micobacteria, de modo que posibilita el contagio horizontal entre humanos infectados (Rivero et al., 2001). Esto parece ser debido a que dicho segmento de inserción suple las deficiencias para la expresión de genes que tiene el gen *phoPR-bovis*, respecto a su gen homólogo en *M. tuberculosis* (Gonzalo Asensio et al., 2014). Algunas cepas de *M. tuberculosis* llegan a presentar hasta 25 copias. *M. bovis* presenta algunas limitaciones, siendo lo habitual en esta micobacteria entre una y cinco copias; comúnmente localizadas en el locus DR (Aranaz et al., 1998; Acosta-salinas et al., 2009). En las cepas de *M. bovis* que únicamente tienen una copia de este elemento móvil, IS6110 está insertada en el DR localizado entre los espaciadores 24 y 25 (Kamerbeek et al., 1997) (repetido en bases moleculares)

No es bien conocido el mecanismo por el que la presencia de IS6110 incrementa la virulencia de los miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex. La inserción de IS6110 en regiones codificantes puede dar lugar a pérdida de actividad génica, mientras que la recombinación homóloga entre dos copias de IS6110 puede originar delección de genes o reordenación de las regiones genómicas implicadas. Como consecuencia de esos cambios genómicos IS6110 puede provocar la expresión de genes colindantes, actuando como un promotor móvil. Los aislamientos de *M. bovis* a partir de humanos holandeses portadores de este elemento de inserción transponible, corresponden a casos de reactivación endógena de TBC, en individuos mayores. Su estudio puso en evidencia que de los 12 lugares de inserción encontrados, 6 loci estaban localizados en regiones intergénicas y otros 6 en regiones codificantes, pudiendo actuar como promotor en al menos 2 casos. Es decir las transposiciones del IS6110 son una forma de adaptación del *M. bovis* a la especie humana (Otal et al, 2009).

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Pf. Dr. Don Javier Hermoso de Mendoza y Salcedo su colaboración en la supervisión de la versión final de este texto.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander KA, et al. (2010) Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16(8):1296-1299.
- 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.
- Angel A. Cataldi and Fabiana Bigi (2013) Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* 4:1, 3-66; January 1, 2013; G 2013 Landes Bioscience.
- 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; 53:1785-9; PMID: 14657105; <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02532-0>.
- 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. 2004a. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2602-2608.
- Aranaz, A., Liebana, E., Pickering, X., Novoa, C., Mateos, A., Domínguez, L. 1996b. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *Vet. Rec.* 138: 276-280.
- Aranaz, A., Romero, B., Montero, N., Álvarez, J., Bezos, J., de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L. 2004b. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a Mycobacterium tuberculosis isogenic laboratory strain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5388-5391.
- Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 1993; 261:1454-7; PMID:8367727; <http://dx.doi.org/10.1126/science.8367727>.
- Asensio, J.G., Maia, C., Ferrer, N.L., Walters, S.B., Laval, F., Barilone, N., et al. (2006) The virulence-associated twocomponent PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* 281: 1313-1316.
- Azad AK, Sirakova TD, Fernandes ND, Kolattukudy PE. Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem* 1997;272:16741-16745. [PubMed: 9201977]
- Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. Are the PEPGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis variable surface antigens? *Mol Microbiol* 2002;44:9-19. [PubMed: 11967065].
- Benítez, JM. (2015). Estudio Epidemiológico de Tuberculosis Humana en Extremadura. Dpto. de Sanidad Animal. UEX. Pp: 221 y sig.
- Blasco B, et al. (2012) Virulence regulator EspR of Mycobacterium tuberculosis is a nucleoid-associated protein. *PLoS Pathog* 8(3):e1002621.
- Blazquez J, Espinosa de Los Monteros L E, Samper S, 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.
- Boatema Ofori-Anyinam, Gregory Dolganov, Tran Van, J. Lucian Davis, Nicholas D. Walter, Benjamin J. Garcia, Marty Voskuil, Kristina Fissette, Maren Diels, Michele Driesen, Conor J. Meehan, Dorothy Yeboah-Manu, Mireia Coscolla, Sebastien Gagneux, Martin Antonio, Gary Schoolnik, Florian Gehre, Bouke C. de Jong (2017) Significant under expression of the DosR regulon in *M. tuberculosis* complex lineage 6 in sputum. *Tuberculosis* 104 (2017) 58e64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2017.03.001> 1472-9792/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
- 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.
- Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* 2001; 69:7326-7333. PubMed: 11705904]
- Brennan MJ, Delogu G. The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol* 2002;10:246-249. [PubMed: 11973159]

- Bretl DJ, Chrystalla Demetriadou, and Thomas C. Zahrt (2011). Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Dec. 2011, p. 566-582
- Brodin P, et al. 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect. Immun.* 74:88-98.
- Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* 2004;12:500-508. [PubMed: 15488391]
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3684-3689. [PubMed: 11891304]
- Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrh, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E.A. (2000) A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 35: 1375-1382.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soolingen, D. 2009. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 2066-2067.
- Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffe M, Guilhot C. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* 2001;276:19845-19854. [PubMed: 11279114].
- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34(2):257-267.
- Charlet D, Mostowy S, Alexander D, Sit L, Wiker HG, Behr MA. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. *Mol Microbiol* 2005;56:1302-1313. [PubMed: 15882422].
- Chesne-Seck ML, et al. (2008) A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Bacteriol* 190(4):1329-1334.
- Cleaveland S, et al. (2007) *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis (Edinb)* 87(1):30-43.
- 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.
- Constant P, Perez E, Malaga W, Laneelle MA, Saurel O, Daffe M, Guilhot C. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. *J Biol Chem* 2002;277:38148-38158. [PubMed: 12138124].
- Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6121-6126. [PubMed: 12724526].
- 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.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59-70.
- Daffe, M., and Etienne, G. (1999) The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis* 79: 153-169.
- Dankner, W.M., Waecker, N.J., Essey, M.A., Moser, K., Thompson, M., Davis, C.E. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 72: 11-37.
- Debbie M. Hunt, Nathan P. Sweeney, Luisa Mori, Rachael H. Whalan, Iñaki Comas, Laura Norman, Teresa Cortes, Kristine B. Arnvig, Elaine O. Davis, Melanie R. Stapleton, Jeffrey Green, and Roger S. Buxton (2012). Long-Range Transcriptional Control of an Operon Necessary for Virulence-Critical ESX-1 Secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* p. 2307-2320.

- 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.
- Dunn PL, North RJ (1995) Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun* 63(9):3428-3437.
- E. Rodríguez, L. P. Sánchez, S. Pérez L. Herrera, M. S. Jiménez S. Samper, M. J. Iglesias (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *INT J TUBERC LUNG DIS* 13(12):1536-1541.
- 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.
- 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: 2258-2260.
- Evans J T, Smith E G, Banerjee A, et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007; 369: 1270-1276.
- Ewann F., Jackson M., Pethe K., Cooper A., Mielcarek N., Ensergueix D., Gicquel B., Loch C., and Supply P. (2002) Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 70:2256-2263.
- Ewann F., Loch C. and Supply P. (2004) Intracellular autoregulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PrrA response regulator. *Microbiology* 150: 241-246.
- Ewann, F., Jackson, M., Pethe, K., Cooper, A., Mielcarek, N., Ensergueix, D., et al. (2002) Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 70: 2256-2263.
- Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, van Helden P, et al. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infections and Immunity* 2002; 70(11):6330-8.
- Fetene, T., Kebede, N., Alem, G. 2009. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Ethiopia. *Zoonoses. Public Health.*
- Frigui W, et al. (2008) Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog* 4(2):e33.
- Galagan JE, et al. (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature* 499(7457):178-183.
- Galagan JE, Minch K, Peterson M, Lyubetskaya A, Azizi E, Sweet L, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature* 2013;499(7457):178e83.
- Galan, J.E., and Curtiss, R., 3rd. (1989) Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 6: 433-443
- 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(3), 203-217.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempé C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7877-7882. [PubMed: 12788972].
- Gehre F, Otu J, DeRiemer K, de Sessions PF, Hibberd ML, Mulders W, et al. Deciphering the growth behaviour of *Mycobacterium africanum*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(5):e2220.
- Gérmán Rehren, Shaun Walters. Patricia Fontan, Issar Smith, and Ana M. Zárraga (2007). Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Jul; 87(4): 347-359.
- Gilmore SA, Schelle MW, Holsclaw CM, et al. Sulfolipid-1 Biosynthesis Restricts *Mycobacterium tuberculosis* Growth in Human Macrophages. *ACS Chemical Biology*. 2012;7(5):863-870. doi:10.1021/cb200311s.
- Ghodbane, R., Drancourt, M., 2013, Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 93, 589-595.
- Gómez M, Doukhan L, Nair G, Smith I. *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 1998; 29:617-28.
- Gonzalo-Asensio J, et al. (2006) The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 281(3):1313-1316.

- Gordon BRG, et al. (2010) Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999;32:643-655. [PubMed: 10320585].
- Gordon SV, et al. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 32(3):643-655.
- Goren, M.B., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., and Armstrong, J.A. (1976) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2510-2514.
- Gortázar, C., Vicente, ., 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.
- Goyal R, et al. (2011) Phosphorylation of PhoP protein plays direct regulatory role in lipid biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 286(52):45197-45208.
- Groisman, E.A. (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183: 1835-1842.
- Groisman, E.A., Chiao, E., Lipps, C.J., and Heffron, F. (1989) *Salmonella typhimurium* phoP virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081.
- Groisman, E.A., Kayser, J., and Soncini, F.C. (1997) Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-g₂⁺ environments. *J Bacteriol* 179: 7040-7045.
- Guerrero A, Cobo J, Fortun J, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet*. 1997 Dec 13;350(9093):1738-42.
- 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.
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., and Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 1, e5.
- Hampshire T, Soneji S, Bacon J, James BW, Hinds J, Laing K, et al. Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(3-4):228-38.
- Haydel S. E., Dunlap N. E., and Benjamin W. H., Jr. (1999) In vitro evidence of the twocomponent system phosphorylation between the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR/TrcS proteins. *Microb. Pathog.* 26: 195-206.
- Haydel S.E. and Clark-Curtiss J.E. (2004) Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 236:341-347.
- Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol* 1996;43:490-499. [PubMed: 8633206].
- Himpens S., Locht C., and Supply P. (2000) Molecular characterization of the mycobacterial SenX3-RegX3 two-component systems: Evidence for autoregulation. *Microbiology* 146: 3091-3098
- 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.
- Hunt DM, et al. (2012) Long-range transcriptional control of an operon necessary for virulence-critical ESX-1 secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 194(9):2307-2320.
- Jesús Gonzalo-Asensio, Wladimir Malaga, Alexandre Pawlik, Catherine Astarie-Dequeker, Charlotte Passemar, Flavie Moreau, Françoise Laval, Mamadou Daffé, Carlos Martin, Roland Brosch, and Christophe Guilhot (2014) Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. Edited by Peter M. Small, Institute for Systems Biology, Bill and Melinda Gates Foundation, Seattle, WA, and accepted by the Editorial Board June 20, 2014 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1406693111 PNAS | August 5, 2014 | vol. 111 | no. 31 | 11491-11496.
- Juarez MD, Torres A, Espitia C. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the mpt83 and mpt70 genes. *FEMS Microbiol Lett* 2001;203:95-102. [PubMed: 11557146].

- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907-914.
- 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.
- Lefevre P, Braibant M, de Wit L, Kalai M, Roeper D, Grotzinger J, Delville JP, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Content J. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 1997;179:2900-2906. [PubMed: 913990].
- Ludwiczak P., Gilleron M., Bordat Y., Martin C., Gicquel B., and Puzo G. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant: lipoarabinomannan molecular structure. *Microbiology* 148: 3029-3037
- MacGurn JA, Raghavan S, Stanley SA, Cox JS (2005) A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 57(6):1653-1663.
- Malhotra, V., Sharma, D., Ramanathan, V.D., Shakila, H., Saini, D.K., Chakravorty, S., et al. (2004) Disruption of response regulator gene, *devR*, leads to attenuation in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett* feb. 16; 23(2): 237-45.
- Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Dubnau E, Gomez M, Smith I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma (H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* 2002; 45:365-74.
- Marina A. Forrellad, Laura I. Klepp, Andrea Gioffré, Julia Sabio y García, Hector R. Morbidoni, María de la Paz Santangelo, Angel A. Cataldi & Fabiana Bigi (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Virulence*, 4:1, 3-66, DOI: 10.4161/viru.22329
- Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, Haeselbarth G, Muller EC, Jungblut PR, Kaufmann SH. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* 2003;24:3405-3420. [PubMed: 14595687]
- Mehra S, Foreman TW, Didier PJ, Ahsan MH, Hudock TA, Kisse R, et al. The DosR regulon modulates adaptive immunity and is essential for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191(10): 1185e96.
- Michel AL, Müller B, van Helden PD (2010) *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol* 140(3-4):371-381.
- Cousins DV, et al. (2003) Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 5):1305-1314.
- 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.
- Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5054-5058.
- Millington KA, Fortune SM, Low J, Garces A, Hingley-Wilson SM, Wickremasinghe M, Kon OM, Lalvani A. (2011). Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 5;108(14):5730-5. doi: 10.1073/pnas.1015153108. Epub 2011 Mar 22.
- 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.
- Monies, R.J., Cranwell, M.P., Palmer, N., Inwald, J., Hewinson, R.G., Rule, B. 2000. Bovine tuberculosis in domestic cats. *Vet. Rec.* 146: 407-408.
- 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.
- Mostowy S, Cousins D, Behr MA (2004) Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* 186(1):104-109.
- Mostowy, S., and Behr, M. a (2005). The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine* 26, 207-16, v-vi.

- Müller B, et al. (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 19(6):899-908.
- Nedeltchev GG, et al. (2009) Extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* but not *Mycobacterium tuberculosis* in a bronchoscopic rabbit model of cavitary tuberculosis. *Infect Immun* 77(2):598-603.
- 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, L.M., Daborn, C.J., 1995, The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1, 1-46.
- Otal, I; Gomez AB; Kremer K; de Haas P; García MJ; Martín C; van Soolingen D. (2009) Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 30;135(3-4):406
- Pang X, et al. (2013) MprAB regulates the espA operon in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates ESX-1 function and host cytokine response. *J Bacteriol* 195(1):66-75.
- Parish T., Smith D. A., Kendall S., Casali N., Bancroft G. J., and Stoker N. G. (2003) Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 71: 1134-1140
- Parish, T., Smith, D.A., Kendall, S., Casali, N., Bancroft, G.J., and Stoker, N.G. (2003b) Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71: 1134-1140.
- Parish, T., Smith, D.A., Roberts, G., Betts, J., and Stoker, N.G. (2003a) The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology* 149: 1423-1435.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, J. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet. Microbiol.* 110: 293-300.
- Passemar C, et al. (2014) Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 16(2):195-213. advanced HIV-1 infection. *Lancet* 1997; 350: 1738-1742.
- Peirs P, Parmentier B, De Wit L, Content J. The *Mycobacterium bovis* homologous protein of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase Mbk (PknD) is truncated. *FEMS Microbiol Lett* 2000;188:135-139. [PubMed: 10913696].
- Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B., and Martin, C. (2001) An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 41: 179-187.
- Perez-Lago, L., Navarro, Y., Garcia-de-Viedma, D., 2014b, Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis* : a review. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S94-S100.
- 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(5-6), 421-428.
- 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.
- Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002;46:709-717. [PubMed: 12410828]
- Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, Dovey C, Cox JS (2008) Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature* 454(7205):717-721.
- Rahim, Z., Mollers, M., te Koppele-Vije, A., de Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., van Soolingen, 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.
- Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004;431:84-87. [PubMed: 15343336]
- Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host Microbe* 2:352-364.

- Romero, B; Rodríguez S; Bezos, J; Díaz, R; Copano, MF; Merediz, I; Mínguez, O; Marqués, S; Palacios, JJ; García de Viedma, D; Sáez, JL; Mateos, A; Aranaz, A; Domínguez, L; and de Juan, L. (2011). Emerging Infectious Diseases www.cdc.gov/eid V.
- Rosalinda Acosta-Salinas, Ciro Estrada-Chávez, Feliciano Milián-Suazo (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión Genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. Review ReviTsiéócn Pecu Méx 2009;47(4):389-412.
- Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.C., et al. (2003) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. Cell Microbiol 5: 405-415.
- Rua Domenech (2006). *m bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis Volume 86, Issue 2, March 2006, Pages 77-109.
- 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.
- Said-Salim B, Mostowy S, Kristof AS, Behr MA. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*. Mol Microbiol. 2006.
- Saini D.K., Malhotra V., Dey D., Pant N., Das T.K., and Tyagi J.S. (2004a) DevR-DevS is a bona fide two component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. Microbiology. 150: 865-875.
- Samper S, Martin C, Pinedo A, et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS 1997; 11: 1237-1242.
- Samper S, Martin C. Spread of extensively drug-resistant tuberculosis. Emerg Infect Dis 2007; 13: 647-648.
- Santangelo MP, Blanco FC, Bianco MV, Klepp LI, Zabal O, Cataldi AA, et al. Study of the role of Mce3R on the transcription of mce genes of *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Microbiol 2008; 8:38; PMID: 18304349; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-38>
- 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.
- Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C, Schoolnik GK. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. J Exp Med 2003;198:693-704. [PubMed: 12953091]
- Shaun B. Walters, Eugenie Dubnau, Irina Kolesnikova, Françoise Laval, Mamadou Daffe and Issar Smith (2006). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis Molecular Microbiology (2006) 60 (2), 312-330
- Shrikrishna, D., de la Rua-Domenech, R., 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.
- Sirakova TD, Thirumala AK, Dubey VS, Sprecher H, Kolattukudy PE. The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. J Biol Chem 2001;276:16833-16839. [PubMed: 11278910].
- Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H., and Kolattukudy, P.E. (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. J Biol Chem 276: 16833-16839.
- Smith NH, Crawshaw T, Parry J, Birtles RJ (2009) *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. J Clin Microbiol 47(8):2551-2559.
- Rivero A, et al. (2001) High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. Clin Infect Dis 32(1):159-161.
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clinical Microbiology Reviews 16, 463-496.
- Solans L, Gonzalo-Asensio J, Sala C, Benjak A, Uplekar S, Rougemont J, et al. (2014) The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog 10(5): e1004183. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004183> 16, 463-496.

- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710-1717. [PubMed: 7729876].
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M. 1997a. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 9869-9874.
- Steyn AJ, Collins DM, Hondalus MK, Jacobs WR, Jr., Kawakami RP, Bloom BR. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3147-52; PMID:
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirolì, M.L., Besnier, J.M., 2009, Humanto-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol* 47, 1249-1251.
- Thoen C.O. 1999. Tuberculosis. In: Straw B., D'Allaire S. *Diseases of swine*.
- Thoen, C.O., and Barletta, R.G. (2006). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans*, pp. 18-33.
- Thorel, M.F. 1980. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle*. 61(2):101-104.
- Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb Pathog* 2001;30:289-297. [PubMed: 11373123].
- Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb Pathog* 2001;30:289-297. [PubMed: 11373123].
- Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry CE 3rd, Kaplan G. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 2005;192:98-106. [PubMed: 15942899].
- Tsolaki, A.G., Hirsh, A.E., DeRiemer, K., Enciso, J.A., Wong, M.Z., Hannan, M., Goguet de la Salmoniere, Y.-O.L., Aman, K., Kato-Maeda, M., and Small, P.M. (2004). Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *PNAS* 101, 4865-4870.
- Une, Y., Mori, T. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 415-425.
- Vogelnest, L., Hulst, F., Thompson, P., Lyashchenko, K.P., Herrin, K.A., 2015, Diagnosis and management of tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) in an Asian elephant (*Elephas maximus*) with a newborn CALF. *J Zoo Wildl Med* 46, 77-85.
- Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* 2003;198(5):705e13.
- Whelan AO, et al. (2010) Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle. *PLoS ONE* 5(1):e8527.
- Zahrt T. C., Wozniak C., Jones D., and Trevett A. (2003) Functional analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* MprAB two-component signal transduction system. *Infect. Immun.* 71: 6962-6970
- Zahrt T.C. and Deretic V. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12706-12711.
- Zahrt, T.C., and Deretic, V. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12706-12711.
- Zumárraga M, Bigi F, Alito A, Romano MI, Cataldi A.A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. *Microbiology* 1999; 145:893-7; PMID:10220168; <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-145-4-893>