

DISCURSO DE INGRESO

del

Excmo. Sr.Dr. D. ELIAS F. RODRIGUEZ FERRI

**MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE  
NUEVA IDENTIFICACIÓN O DE  
INTERÉS CRECIENTE  
(PATÓGENOS EMERGENTES)  
EN LOS ANIMALES. ZONOSIS**



Depósito Legal B. 45.943 - 1995

---

Impreso en G. Cromotip, S.L. Cobalt, 8 - 08038 Barcelona

***EXCELENTÍSIMO SEÑOR PRESIDENTE***  
***EXCELENTÍSIMOS SEÑORES ACADÉMICOS***  
***SEÑORAS Y SEÑORES***

Permitidme que mis primeras palabras sean de agradecimiento hacia esta Docta Corporación, que en este acto me acoge en su seno, dispensándome con ello el mas extraordinario honor para un modesto veterinario que humildemente ha dedicado toda su vida al ejercicio de la profesión vinculado con la docencia, sin apartarse de otras responsabilidades dentro y fuera de la Universidad, pero siempre con la perspectiva sanitaria como eje fundamental de su vida. Permítanme Vds, Excelentísimos Señores, que personalice mi agradecimiento en dos miembros de esta Real Academia, D. Laureano Saiz Moreno y de D. Guillermo Suárez Fernández. Del primero, ejemplo de laboriosidad y entrega, recuerdo mis primeros encuentros con el fondo del recién creado Ministerio de Sanidad y Seguridad Social (entonces) y en especial, de la Escuela Nacional de Sanidad, a quien se mantuvo vinculado durante tantos años, y a cuyo prestigio colaboró de forma tan notable. Seguramente fué mi condición de colaborador y discípulo del Profesor Ovejero del Agua, el mejor pasaporte para que el Dr. Saiz Moreno sintiera por mí una especial debilidad, que muchas veces me manifestó, cuando en alguna de las colaboraciones a Congresos o Reuniones, ambos trabajabamos sobre algún tema sanitario; al Dr.Saiz Moreno, le debo entre otras cosas buena parte de mi afición por los temas sanitarios, y de modo particular, mi dedicación al estudio de las zoonosis, tema en el que como es sabido, constituye con su dilatada experiencia, una autoridad mundialmente reconocida. Del Profesor Guillermo Suárez Fernández me resulta difícil hablar sin caer en el tópico. Ambos coincidimos en nuestro origen con el Profesor Ovejero, y con él me «enganché» en el mundo de la Microbiología. En él

decidí un buen día confiar la dirección de mi Tesis Doctoral, y ello pese a la distancia entre mi lugar de residencia en León, y su ubicación entonces como Catedrático de Microbiología en la Facultad de Farmacia de Barcelona. Nuestro contacto desde entonces ha sido constante y provechoso para ambos. Con él colaboré en la Facultad de Veterinaria de Madrid, a la organización de un grupo entonces de halagüeñas promesas y hoy ya excelentes realidades, que han situado el nivel de la Microbiología Veterinaria, probablemente en uno de los puntos culminantes en los últimos 20 ó 25 años. Con él he aprendido mucho mas que la propia observación y estudio de los microorganismos. En el Profesor Suárez encontré no solo al maestro sino también al amigo, cuya fidelidad por ambas partes, hemos mantenido sólidamente a lo largo de todos estos años. A ambos, desde esta Tribuna y al Profesor Ovejero, desde el recuerdo, dedico mi más sentido agradecimiento.

Mis compañeros primero de la Facultad de Veterinaria de Madrid, a los que ya me he referido, y en la actualidad de mi Facultad de Veterinaria en León, en la que me formé y a la que ahora sirvo, de modo muy especial a los tres jóvenes veterinarios, hoy ya Doctores, César B. Gutiérrez Martín, Rubén I. Tascón Cabrero y José I. Rodríguez Barbosa, que fueron los primeros en depositar en mí su confianza, responsabilizándome de su formación de postgrado. Ellos abrieron la puerta a otros (Oscar, Delfina,...) que han venido después, con los que ahora trabajo, y que como los anteriores son aquí y ahora objeto de mi reconocimiento y recuerdo. Su vitalidad, su entrega, su capacidad de trabajo, su madurez, han sido y son el mejor aliciente diario para continuar con ilusión en la apasionante aventura de la Universidad. Con ellos, vaya también un recuerdo para mis amigos, mis compañeros, colegas o no, de antes y ahora, a quienes debo muchos buenos ratos, muchos buenos consejos, muchas buenas ayudas.....

No quiero desaprovechar este momento, para rendir mi mejor y mas cariñoso recuerdo a los míos, a mi familia mas próxima, a mis padres de quienes aprendí lo que significa el amor al trabajo y el ejercicio de la responsabilidad en cuantas empresas me he comprometido, a mi mujer Conchita y a mis hijos, Fernando y Alberto, para quienes muchas veces la dureza y dedicación de nuestro trabajo ha supuesto inconvenientes, que solo desde la tolerancia y el cariño se valoran en su justa medida. Especialmente a estos últimos he pretendido ofrecer por encima de banalidades un modelo de comportamiento que con sus defectos, prepare sus espíritus en el difícil camino de este competitivo mundo de finales de siglo. A los tres, principales destinatarios de lo bueno y de lo malo que hay en mí, les dedico mi principal homenaje y confio en que con indulgencia vean en estas palabras la parte mejor de mis sentimientos.

A todos, mi agradecimiento.

## INTRODUCCION

La denominación «emergente» utilizada con profusión en el continente americano, hace referencia tanto a la aparición de una enfermedad que se descubre por primera vez, como a un principio renovado y diferente de una enfermedad conocida con anterioridad. Consecuentemente los agentes etiológicos correspondientes reciben el nombre de «agentes emergentes»; En nuestro continente parece mas preciso aludir a los agentes (y enfermedades) recién identificados o aquellos en los que cualquier causa promueve un incremento de su presencia que conduce al interés creciente de los mismos. Aunque el uso de estos conceptos resulta relativamente nuevo, su manejo empirico es sin embargo muy antiguo.

A lo largo de la Historia la aparición de este tipo de agentes y enfermedades, han estado asociados a la presencia de epidemias (a veces pandemias) que dejaron profundas huellas en la Sociedad. En la Edad Media la peste bubónica fue el prototipo de enfermedad emergente, con un saldo de muertes tan dramático que solo en cuatro años mató a la cuarta parte de la población europea. En este siglo la pandemia de gripe de 1918 también se saldó con millones de víctimas en todo el mundo.

Solamente en las dos últimas décadas, hemos visto un gran número de procesos nuevos o de interés creciente en el ser humano, que encajarían perfectamente en el marco de los agentes y las enfermedades que dan título a este discurso; primero fue la enfermedad de los legionarios, más tarde se conoció el síndrome del shock tóxico, la enfermedad de Lyme, la fiebre de Ebola-Marburgo, y poco a poco hemos ido conociendo el síndrome de la inmunodeficiencia humana y un número de enfermedades que se asocian con él (listeriosis, tuberculosis, criptosporidiosis, etc.). Mucho más recientemente han hecho su aparición la neumonía por hantavirus, el síndrome urémico hemorrágico, producido por *Escherichia coli* 0157:H7, las enteritis producidas por *Campylobacter*, etc.. Otras infecciones han desarrollado resistencias a las drogas que hacen su tratamiento difícil y a veces prácticamente imposible; es lo que sucede por ejemplo en el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, o los modelos de resistencias que están apareciendo últimamente en el caso de enterococos y estafilococos resistentes a la vancomicina. Como se ha señalado recientemente (Lederberg, 1994), la década de los años noventa está siendo marcada por la demostración de que la especie humana está todavía encerrada en un forcejeo darwiniano con nuestros predadores microbianos; después de décadas de optimismo, identificadas con la era de los antibióticos, la aparición de estos agentes, en particular del virus de la inmunodeficiencia humana ha representado un punto de retorno que ha situado las cosas en

su verdadero lugar, como demostrando al hombre su debilidad, pese a todo, frente al mundo de los microorganismos patógenos.

En el campo animal, la situación posee su natural correspondencia; la peste bovina en el siglo XVIII, el carbunco bacteridiano y la rabia en el siglo XIX o la enfermedad de Newcastle en el presente, constituyen ejemplos bien significativos. A partir de los años cincuenta, con la introducción de una tecnología de producción moderna, ajustada a la especie, han ido apareciendo procesos nuevos. Solo por recordar algunos habría que referirse por ejemplo, al parvovirus canino, el síndrome respiratorio reproductivo porcino, la pleuroneumonía porcina, la enfermedad hemorrágica vírica del conejo, la encefalopatía espongiiforme, etc.

No existe pues ninguna duda de que la aparición súbita de estos agentes patógenos, aparentemente nuevos, es de gran importancia en Microbiología y un hecho que se produce con cierta frecuencia, no pudiendo ser considerado un suceso aislado.

La virulencia extremadamente alta que caracteriza a muchos de estos agentes independientemente de su condición (bacterias, hongos, virus) y en ocasiones la mortalidad de que son causa, ponen de manifiesto una adaptación incompleta, proceso que consume de ordinario un largo periodo de tiempo, al final del cual se logra el equilibrio en la relación parásito-hospedador.

La Academia Nacional de Medicina de los Estados Unidos, publicó en 1992 el libro de J. Lederberg *«Infecciones emergentes: amenazas microbianas para la salud en los Estados Unidos»*; desde entonces ya son varias las publicaciones que específicamente vienen ocupándose de este tema. Para este año, el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades Transmisibles (CDC) de Atlanta, anunció una nueva publicación periódica titulada *«Emerging Infectious Diseases»*, que forma parte de un plan de dicho centro para la lucha contra estos procesos, y cuyas líneas maestras fueron publicadas previamente (CDC, 1994).

Hoy día es una cuestión perfectamente asumida, que un patógeno microbiano es capaz de difundirse por todo el mundo en un espacio de tiempo tan corto como 24 horas; es suficiente que los modernos procedimientos de traslado se contaminen con él o que cooperen en el transporte de material contaminado, permitiendo así la aparición de brotes de enfermedad en lugares muy alejados del foco original. Debe recordarse que los primeros culpables de la enfermedad no son personas ni entidades jurídicas, sino los agentes etiológicos de las mismas, los microorganismos en sentido amplio, los cuales como tantas veces se ha dicho no entienden de fronteras, ni de leyes. Por esta razón la salud de un país, nación o territorio se halla en la actualidad inevitablemente unida a la de otros, especialmente los más próximos, pero sin descartar a ninguno, y por ello la vigilancia global para este tipo de infecciones emergentes, resulta vital para la salud pública. Tal vez sean este tipo de agentes y las enfermedades producidas por ellos, el mejor motivo para justificar la colaboración y coordinación de científicos y profesionales de la salud, de todos los países (J.Lederberg, 1994).

El **carácter emergente** de un microorganismo, cualquiera que sea su medio de difusión (alimentos, aéreo, etc.), puede expresarse a través de alguna de las siguientes manifestaciones:

- a) su aparición «*de novo*», esto es, por primera vez.
- b) su recrudescimiento en todos o en alguno de los aspectos que constituyen su expresión patógena.
- c) su recrudescimiento frente a los procedimientos tradicionales y efectivos aplicados a su lucha y control.
- d) la implicación de un tipo de transmisión nuevo, en microorganismos ya conocidos de la ciencia médica.

En muchos casos, el conocimiento de aspectos nuevos en las enfermedades transmisibles por alimentos, por ejemplo, ha llevado a valorar circunstancias que parecían impensables en otros tiempos, desconocidos unas veces o a las que no se prestaba atención en otros. Es bien conocido por ejemplo, que entre el 1-2% de los individuos afectados por problemas entéricos, desarrollan al cabo del tiempo problemas de artritis reactivas, en forma de cuadros muy dolorosos y de difícil tratamiento, como sucede por ej., en el caso de la salmonelosis. Estos hechos en la actualidad constituyen por si mismos un importante motivo de análisis y estudio.

## **FACTORES RELACIONADOS CON LA EMERGENCIA**

Aunque los mecanismos de emergencia no siempre se comprenden con facilidad, el estudio conjunto de estos agentes, de las infecciones y las enfermedades producidas por ellos, revelan una serie de circunstancias que podrían considerarse como elementos predisponentes, cuando no desencadenantes de la condición o si se quiere, de la expresión de este carácter en los microorganismos patógenos; en cualquier caso su relación con la condición «emergente» resulta bien evidente.

La estructura sanitaria de los países desarrollados, con la aparición de los grandes hospitales construidos en las últimas décadas, auténticas ciudades sanitarias, dotados de los mas modernos métodos informáticos, coopera positivamente en la detección de los cambios patológicos que se suceden en las poblaciones, a la vez que permiten disponer de grandes archivos de datos, con capacidad de análisis para desarrollar estudios prospectivos o retrospectivos. La primera alarma que justificó por ejemplo noticias en relación con el carácter emergente de *Listeria monocytogenes* surgió precisamente de este modo. En el mundo animal, muchas veces esta función está asumida por los grandes mataderos.

## 1. Cambios sociales y en el comportamiento.

### Crecimiento de la población, densidad y distribución

La propia actividad ejerce sobre el hombre, enormes presiones de índole competitivo; los **cambios sociales** repercuten inevitablemente en estos aspectos.

Desde los **cambios demográficos** consecuencia de la **migración rural** a las ciudades en busca de mejores oportunidades laborales, que incrementa la densidad de población, a cuanto afecta **al empleo cada vez mas frecuente de la mujer**, son causas que obligan a realizar las comidas en el centro laboral o de estudio correspondiente.

En estas condiciones, tampoco se dispone habitualmente de tiempo suficiente para la preparación tradicional de los alimentos con lo que los modelos de aprendizaje cada vez son mas escasos, y los miembros mas jóvenes de las familias (niños y adolescentes) desconocen cómo manipular correctamente los alimentos.

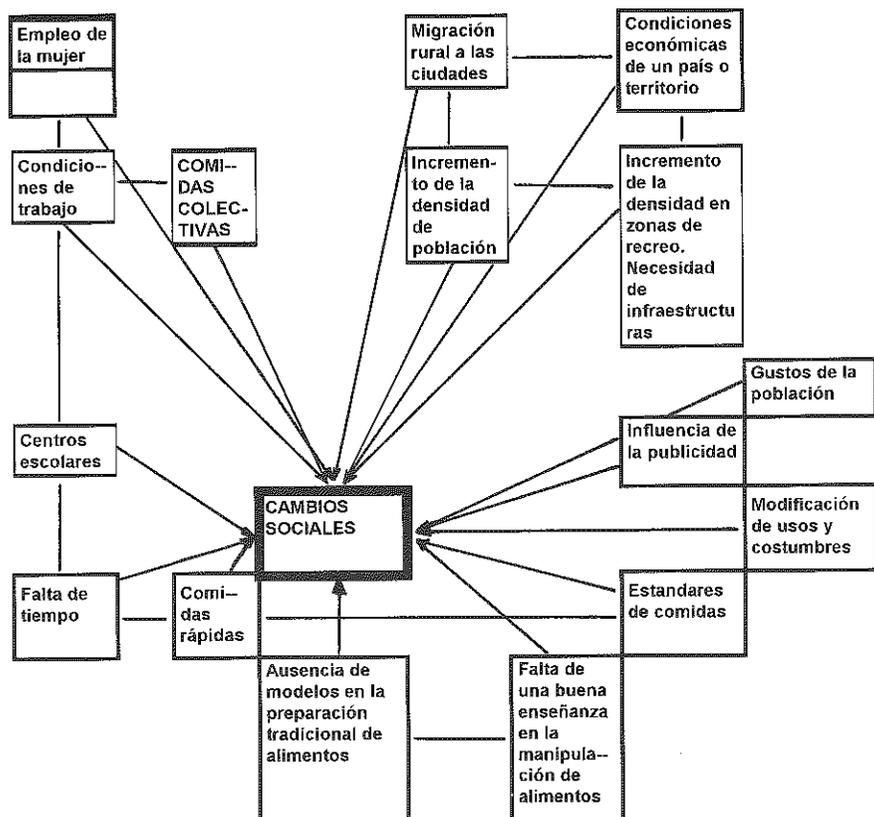
Igual consideración e importancia deben tener el incremento de los viajes internacionales, cuyo valor desde este punto de vista, enlaza íntimamente con cuanto señalabamos a propósito de la velocidad de difusión de los agentes de las enfermedades infecciosas.

Los **gustos de la población** por determinado tipo de comidas, unas veces consecuencia de hábitos o costumbres ancestrales, pero con frecuencia fruto probable de la manipulación machacona de una publicidad insistente en todos los medios de comunicación, que al final modifican los usos y costumbres culinarias mas tradicionales; los tipos de materias primas (en las

que muchas veces la reducción del costo que condiciona baja calidad se disfraza a base de todo tipo de aditivos y de avanzadas tecnologías de presentación atractiva) y en definitiva el tipo de comida hacia estándares previamente objetivados a través de complicados procesos de marketing, son también importantes factores que influyen en la emergencia de agentes patógenos de todo tipo.

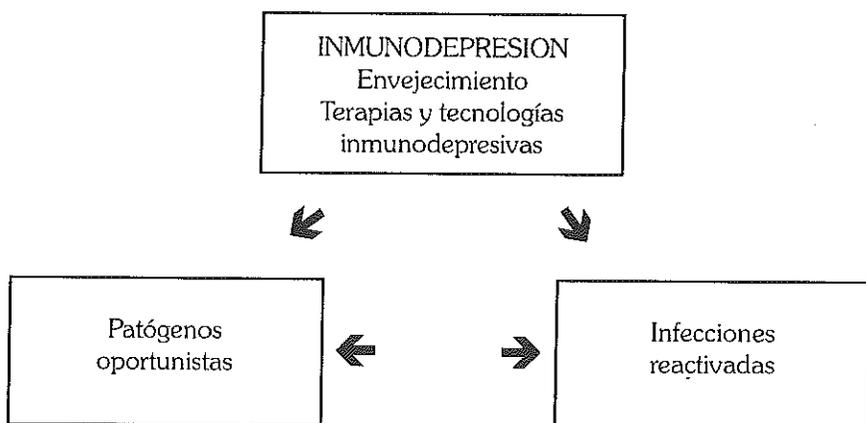
Cambios sociales derivados **de la situación económica de un país o región**, también traducen efectos sobre estos agentes. El fuerte impacto de la economía de los Estados Unidos entre 1960 y 1980 permitió asimismo una fuerte densidad de población humana en las zonas costeras, superándose todo tipo de previsiones urbanísticas. La consecuencia fué que los sistemas de saneamiento y depuración de residuos se vieron desbordados y se produjeron problemas de contaminación que afectaron no solo en el suministro de agua de consumo, sino también a los abastecimientos en zonas de cultivo de moluscos y crustáceos situadas en las proximidades a las ciudades. En estos años, los casos de hepatitis e infecciones por virus Norwalk en los que se implicó el consumo de estos productos contaminados, incrementaron espectacularmente. El mismo efecto, coincidiendo con la explosión del turismo en nuestro país, se ha observado repetidamente en muchos asentamientos turísticos de la costa. En la Fig 1 se relacionan todos los factores que originan cambios sociales y en el comportamiento.

Fig. 1. Interrelación de factores que producen cambio social



### Inmunosupresión de la población

Un problema nada despreciable, lo constituye **el envejecimiento** de la población humana, particularmente ostensible en países desarrollados de América del Norte y Europa, que plantea necesidades especiales en muchos individuos de edad superior a los 65 años en términos de inmunodepresión; Muchas sustancias inocuas para la población adulta de entre 20 y 50 años, pueden resultar sin embargo muy peligrosas para este otro tipo de edades, igual que ocurre con los niños.



Las pandemias de SIDA o las de gripe humana; los nuevos tratamientos con terapias y tecnologías inmunosupresoras (terapias para artritis y vasculitis reumatoide, quimioterapia del cáncer, transplante de órganos, etc.) han proporcionado un aumento espectacular de las infecciones por los denominados patógenos oportunistas.

Las «**infecciones reactivadas**» son también otro tipo de infección por patógenos oportunistas, que puede reactivarse durante la inmunosupresión; este hecho, particularmente frecuente en el caso de infecciones humanas por *Mycobacterium tuberculosis*, es menos aparente en el caso de infecciones humanas por *Mycobacterium bovis* (su causa no está bien establecida), pero se describe ocasionalmente en países actualmente sin tuberculosis bovina, en individuos nacidos antes de que se completaran los programas de erradicación y de estos, la mitad de los casos aproximadamente implican los pulmones (OMS, 1993).

## 2. Tecnología e Industria

De igual modo, los cambios que se suceden en los métodos de recogida, procesamiento, preparación, transporte, conservación o venta de los alimentos, promueven distinto tipo de situa-

ciones que pueden influir sobre la inocuidad de nuestros productos. Analizaremos algunos de los cambios mas significativos en los distintos niveles.

**Producción y recogida de los alimentos:** Se pueden producir cambios en la tecnología de los centros de producción que influyen directamente sobre los este tipo de agentes. En la propia explotación, los nuevos métodos de producción intensiva de mamíferos y aves, con sus correspondientes y modernos métodos de manejo, facilitan especialmente la aparición de patógenos respiratorios y entéricos; la selección de razas de alta producción implica además contrapartidas importantes en el aspecto sanitario, por su mayor susceptibilidad a los agentes de infección. El destete precoz, las ajustadas dietas pensadas específicamente desde un punto de vista costo/beneficio, originan con frecuencia no pocos problemas de salud en relación con algunas enfermedades infecciosas o parasitarias.

Aspectos relacionados con la producción alimentaria completamente nuevos, como es el caso de la aparición de los cultivos marinos, son consecuencia de haber alcanzado en muchas especies los límites permisibles compatibles con la propia supervivencia de las especies en su medio natural, razones que han obligado así a la búsqueda de nuevos procedimientos de cultivo que alivien la carga piscícola de mares y océanos. A medida que se progresa en este tipo de cultivos intensivos marinos comienzan a manifestarse también procesos patológicos hasta ahora desconocidos en estos animales, como es el caso de las infecciones por *Aeromonas hydrophila* (*Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas trola* y *Aeromonas schubertii* entre otros, han sido implicadas como causa de infecciones transmitidas por alimentos en el hombre) tradicionalmente considerados patógenos oportunistas, que condicionan su intervención a la coincidencia con factores estresantes inmunodepresores. La modificación de las condiciones naturales de vida de estos animales como

consecuencia de la propia densidad, de su alimentación artificial, con condiciones artificiales de cultivo (temperatura, tratamientos del agua, etc) promueve el desarrollo de estos microorganismos y la expresión de factores de virulencia hasta ahora desconocidos. Seguramente no es una coincidencia que en el ser humano se comiencen a ver ya con cierta frecuencia infecciones producidas por este agente, particularmente en individuos sometidos a condiciones inmunodepresoras. Además, puesto que el agua de los cultivos marinos o continentales revierte a los cursos naturales, se mantiene la posibilidad residual de transmisión de estos procesos desde las especies en cultivo a las silvestres, cuestión que ha sido comprobada en la práctica en diversas ocasiones en el salmón (forunculosis) o en la trucha (saprolegniosis) (Landesman, 1994).

**El uso de antibióticos en la alimentación animal,** constituye también un ejemplo de la presión ambiental a la que están sometidos muchos microorganismos a lo largo del tiempo y que produce entre otras consecuencias un aumento importante en el número de resistencias (ver después), cuando no cambios genéticos en los mismos. Aunque los países desarrollados han evolucionado en su legislación, prohibiendo el uso de la mayoría de estas sustancias en la alimentación, muchos lugares del mundo aún permanecen sin controles claros de restricción o estos son mínimos; en cualquier caso, antibióticos y otros antimicrobianos se utilizan preventiva o curativamente en el tratamiento de enfermedades bacterianas o fúngicas de los animales productores de alimentos, en ocasiones en cantidades significativas y muchas veces sin mediar tiempo suficiente para su eliminación, y de un modo fraudulento, los alimentos de este origen (leche o carne fundamentalmente) son librados al consumo manteniendo aún altos niveles residuales de dichas sustancias (Strauch, 1987).

Por si fuera poco, **aspectos incontrolables como el clima,** pueden también ejercer un efecto muy importante. En los últimos 20-25 años, por ejemplo, los efectos de **la sequía** sobre

el crecimiento de hongos en diferentes productos agrícolas (el estrés producido por la sequía conduce a un aumento de la susceptibilidad por hongos toxigénicos) ha sido repetidamente comunicado por muchos autores (Pitt, 1994). Por otra parte, también **las inundaciones** causadas por una amplia diversidad de fenómenos naturales, facilitan la contaminación de materias primas que después son utilizadas en la elaboración de alimentos de consumo animal o humano.

**Cambios en la tecnología del procesado de los alimentos:** Es muy conocido el uso de películas o envoltorios de plástico en la comercialización de vegetales, setas crudas u otros alimentos. El ambiente anaeróbico interior favorece la germinación de esporos de *Clostridium botulinum*. Se han descrito otros sucesos parecidos como consecuencia de la conservación de setas en salmuera, dentro de bolsas, condiciones en las que se selecciona *Staphylococcus aureus*, problemas por ej., que se han detectado tiempo atrás en China.

**Cambios en el tamaño de la industria alimentaria:** Con carácter general, el cambio en los últimos veinticinco años de una industria alimentaria familiar o de barrio (que cuando se implica en problemas de tipo microbiológico produce un número de casos reducido, relacionado con su tamaño), a un tipo de industria de alcance nacional o internacional (multinacionales del sector de la alimentación) con una organización enormemente compleja, hace que cuando surge un problema, su dimensión puede llegar a ser de gran envergadura, con cientos o incluso miles de personas enfermas; En este sentido además, la perspectiva de reducción de fronteras y barreras comerciales en todo el mundo exige cada vez mayor cautela. El tratado de libre comercio en América del Norte y su correspondencia con el GATT<sup>1</sup> en la Unión Europea, obligará en el futuro al diseño de nuevos sistemas de control.

### 3. Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales constituyen uno de los mas graves problemas de la Moderna Medicina Hospitalaria, pues según se ha calculado 1 de cada 20 pacientes que ingresan en los hospitales (aproximadamente el 5% del número total de hospitalizados en Estados Unidos), sufren de infecciones hospitalarias por virus, bacterias, hongos o protozoos, siendo estas tasas hasta 5 ó 10 veces superiores en los países en desarrollo. Según algunos autores (Brun Buisson, 1994), las infecciones adquiridas en el medio hospitalario constituyen el precio a pagar por la aplicación de la tecnología médica moderna a enfermos cada vez mas críticos, cuya supervivencia se prolonga merced a ella.

Las infecciones nosocomiales poseen su antecedente histórico en las grandes infecciones epidémicas que como en el caso del tifus, cólera o fiebre puerperal, ingresaban en el ambiente hospitalario desde el mundo exterior. El desconocimiento de las medidas de higiene y de su transmisión a través de las manos y utensilios del personal cuidador, era el responsable de su circulación en el interior de los hospitales.

En la actualidad, las infecciones nosocomiales se deben por un lado a **microorganismos presentes en la flora digestiva, orofaríngea o cutánea de los enfermos**, no patógenos en su medio natural, pero capaces de producir manifestaciones clínicas en presencia de circunstancias concurrentes, por lo general representadas por la presencia de cuerpos extraños o de úlceras. Este tipo de microorganismos suelen ser causa frecuente de infecciones urinarias, después de la colocación de sondas, implantación de catéteres, prótesis, etc. A veces, son origen de graves complicaciones según el punto donde se produce la colonización (endocarditis, artritis, meningitis, etc.). Otro origen de infecciones nosocomiales está representado por **la infección por patógenos no convencionales, oportunistas**, que se aprovechan de la condición de depresión inmune del hospedador. Muchas infecciones oportunistas se deben a la reactivación de una infección anterior, o a la transmisión inaparente del agente (en el caso por ej., de transplante de órganos procedentes de donadores portadores de estos microorganismos).

Los agentes de infecciones nosocomiales incluyen desde bacterias fácilmente susceptibles al tratamiento con antimicrobianos (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) hasta otros mucho más refractarios, como es el caso de *Enterobacter*, de *Pseudomonas*, de *Enterococcus*, *Cándida*, etc., Otros muchos factores que incrementan el riesgo de infección en un hospital, son inherentes a cualquier establecimiento de cuidados de salud.

#### 4. Viajes y comercio internacionales

Los viajes implican el movimiento desde un lugar a otro distinto, tanto de seres humanos como de los animales vivos y consecuentemente con ambos el de microorganismos, siendo este un factor que contribuye al carácter emergente de las infecciones. La **novedad** del microorganismo, su **transmisibilidad** y la existencia de un **ambiente conveniente** para su mantenimiento, resultan igualmente fundamentales en la emergencia. En este punto es importante diferenciar entre: a) **entradas transitorias** de patógenos extraños y adquisición de **enfermedades nuevas**, situaciones ambas que por lo general que se dan con cierta frecuencia, y b) **establecimiento y propagación de un nuevo patógeno**, situación que se dá con menor frecuencia.

El **transporte internacional de mercancías** incluyendo alimentos, tanto de origen animal como de otros orígenes para el consumo humano, es muy importante en la práctica. También lo es el de cualquier otro tipo de mercancías, incluidas las materias primas para alimentos de animales, causa que ha contribuido indirectamente a la emergencia de un buen número de enfermedades, aunque muchas veces no son las propias mercancías las responsables en sí mismas del problema, sino más bien son animales infectados en las bodegas donde se sitúan los cargamentos en aviones o barcos, los responsables de la contaminación del producto, cuando no estos o aquellos contaminan los suministros de agua, con las mismas consecuencias. En estas condiciones y como ya ha sido comentado, un potencial patógeno puede viajar en el plazo de muy pocas horas, a través de todo el mundo.

## 5. Evolución y adaptación microbiana

### Variación natural y mutación:

Los microorganismos son sumamente numerosos y diversos, pero solamente una pequeña parte de ellos son capaces de causar enfermedad en los animales o en el hombre. Para sobrevivir, la mayoría y con independencia de su carácter patógeno, deben adaptarse a un nicho ecológico concreto y competir efectivamente con otros microorganismos. Su pequeño tamaño y la alta relación superficie-volumen facilita el rápido crecimiento y el gran impacto sobre el ambiente. Los patógenos microbianos pueden colonizar animales, seres humanos e invertebrados, para cuyo fin han desarrollado o simplemente adquirido un numeroso tipo de genes o de productos de ellos, que les permite esta función. Estos productos génicos resultan extremadamente variados e incluyen desde factores implicados en la transmisión desde un hospedador a otro, hasta los que se implican en la unión a la superficie celular, en la invasión, en el bloqueo o «escape» a las respuestas defensivas del hospedador tanto específicas como inespecíficas, en la capacidad para persistir o sobrevivir dentro o fuera de un hospedador y en la resistencia a las drogas antimicrobianas. Microorganismos apatógenos pueden transformarse en patógenos virulentos (un suceso raro) y patógenos de baja virulencia pueden transformarse en altamente virulentos mediante mutación, recombinación o transferencia genéticas.

A consecuencia de las cantidades relativamente pequeñas de ADN, ARN o ambos, de la rápida tasa de crecimiento y de las grandes poblaciones que en consecuencia pueden obtenerse, los patógenos microbianos pueden evolucionar y adaptarse con mucha rapidez.

Todos los tipos de microorganismos manifiestan **mutaciones** de su genoma a lo largo del tiempo, siendo por lo general la tasa con la que estas se producen inversamente proporcional a su

tamaño, lo que en la práctica implica que los virus muten con mas frecuencia que bacterias, hongos o protozoos. La presión inmunológica hace que con carácter general, la tasa de mutación de los genes que codifican para proteínas de superficie sea más alta que la de los genes que codifican para proteínas internas, sean estas estructurales o no. Estos mecanismos de evolución les permiten adaptarse a las nuevas células hospedadoras o a los nuevos hospedadores, producir nuevas toxinas, escapar, eludir o simplemente suprimir las respuestas del hospedador y desarrollar resistencias a sustancias antimicrobianas y anticuerpos.

La **capacidad para adaptarse** es un requisito fundamental para el éxito en la propia competición microbiana y en la supervivencia evolutiva de cualquier forma de vida, pero resulta particularmente crucial en el caso de los microorganismos patógenos, que deben hacer frente tanto a las defensas del hospedador como a la competencia con otros microorganismos que forman parte de la flora natural de este. Existen a este respecto un numeroso grupo de determinantes que pueden ejercer, una clara influencia sobre los acontecimientos evolutivos; de hecho, aunque los hospedadores puedan ayudar a conducir la evolución de sus parásitos, lo contrario es probablemente tan cierto. La coevolución de los microorganismos patógenos y sus hospedadores animales y humanos, continuará siendo un desafío para la ciencia médica, porque el cambio, la novedad o la inexperiencia, son pilares que se construyen en tales interrelaciones.

La **recombinación genética** constituye un claro mecanismo de evolución y adaptación microbiana. La infección múltiple de una célula con dos o mas tipos de virus distintos o con cepas diferentes del mismo virus, igual que la infección múltiple con especies de bacterias, es el primer paso que permite el intercambio y recombinación de material genético, que puede ser origen de cambios súbitos y profundos en el fenotipo del agente.

En el caso de los virus que poseen un genoma fragmentado (virus influenza, reovirus, etc) **la redistribución** es igualmente un mecanismo de evolución de gran importancia, particularmente cuando se produce la coinfección de una célula por estos microorganismos.

En la Tabla 1, se recogen algunos de los determinantes de evolución de mayor interés en el caso de los virus.

**Tabla 1:**  
**MECANISMOS DE EVOLUCION EN LOS VIRUS**

MECANISMO	EJEMPLO
Mutaciones puntuales	El cambio de un aminoácido sencillo afecta a la virulencia: Influenza aviar letal. Mutaciones en el virus de la panleucopenia felina permitieron la oobatencción del parvovirus canino.
Recombinación intramolecular	Inserción de un trozo de genoma: Encefalitis eq. del Este y virus tipo Sindbis Virus de la Encefal. eq. del Oeste.
Reorganización (redistribución) genética	Origen de las pandemias de gripe de 1957 y 1968: genes para proteínas externas, de virus animales
Recombinación y mutación	Evolución de las vacunas vivas de virus de la polio después de la administración.
Hipermutación parcial (transiciones de uridina a citosina)	Evolución del virus de la panencefalitis esclerosante subaguda a partir del virus del sarampión
Reordenamiento genético	Evolución del virus de la rubéola
Recombinación entre mutantes delectivos	Regeneración de la función del genoma de virus de plantas.

(Kilbourne, 1991. Tomado de Lederberg *et al*, 1992)

En la propia evolución, una serie de restricciones y oportunidades influyen en el resultado final del procedimiento (Tabla 2)

**Tabla 2: EVOLUCION DE NUEVOS VIRUS:  
RESTRICCIONES Y OPORTUNIDADES**

<b>RESTRICCIONES</b>	<b>OPORTUNIDADES</b>
Las alteraciones extremas en los virus son letales	Altas tasas de mutación virica
Pueden existir requerimientos para la coevolución de las proteínas víricas celulares	Interacción genética entre virus
La supervivencia virica requiere un nivel crítico de viruela	Los cambios ecológicos incrementan las oportunidades para el contacto del hombre con vectores de virus
La propagación en un hospedador extraño tiende a ser atenuante	Cambios en el comportamiento humano (por ej. en el aspecto sexual)
La penetración de la barrera inmunológica humana generalmente requiere cambios antigénicos principales	Comportamiento alterado de los virus en los hospedadores inmunocomprometidos
La infección del hombre con un virus de origen animal tiene lugar en ocasiones, pero no siempre es contagiosa	

(Kilbourne, 1991, adaptado por Lederber, 1992)

En el caso de las bacterias se producen **factores de virulencia** que poseen funciones críticas en la patogénesis: permiten a la bacteria resistir a los mecanismos inespecíficos de aclaramiento, ayudan a adquirir los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia, permiten resistir los mecanismos inmunes y les proporcionan ventaja en la competencia con otros microorganismos asentados en el hospedador, etc. Los factores de virulencia varían de un microorganismo a otro y pueden transmitirse entre bacterias receptivas mediante bacteriofagos y plásmidos. Este movimiento de material genético es una forma mediante la cual la bacteria hace frente a los cambios en su ambiente, como puede ser la presencia de antibióticos o de células fagocíticas. Las bacterias pueden poseer más de un tipo de factor de virulencia, incluyendo enzimas, toxinas, factores de colonización, adhesinas, bacteriocinas, hemolisinas, invasinas y factores de resistencia a las drogas. En las tablas 3 y 4 se presentan algunos de los factores de virulencia comunes en las bacterias, así como su codificación por bacteriófagos, plásmidos y transposones.

**Tabla 3.**

**FACTORES DE VIRULENCIA QUE PROMUEVEN  
LA COLONIZACION Y SUPERVIVENCIA DE LAS  
BACTERIAS INFECTANTES**

<b>FACTOR DE VIRULENCIA</b>	<b>FUNCION</b>
Pili	Adherencia a las superficies mucosas
Adhesinas no fimbriales	Unión a la célula hospedadora
Reordenamiento de la actina en las células hospedadoras	Fagocitosis forzada de las bacterias por células normalmente no fagocíticas. Movimiento intracelular o desde una célula a otra.
Movilidad y quimiotaxis	Alcance de las superficies mucosas, especialmente en áreas con flujo rápido.
Proteasas para IgA secretora	Prevención de la fijación de las bacterias por la mucina.
Sideróforos, proteínas de superficie que unen transferrina, lactoferrina, ferritina o hemina.	Adquisición de hierro por las bacterias.
Cápsulas (generalmente polisacáridos)	Prevención de la fagocitosis; reducen la activación del complemento.
LPS. Antígeno O	Resistencia al suero
Peptidasa C5a	Interfiere con la función señal del complemento.
Variación en los antígenos de superficie	Evaden la respuesta de anticuerpos.

Tabla 4.

**EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE FACTORES DE VIRULENCIA CODIFICADOS POR PLASMIDOS, TRANSPOSONES Y BACTERIOFAGOS**

<b>ELEMENTO GENETICO MOVIL</b>	<b>MICROORGANISMO</b>	<b>FACTOR DE VIRULENCIA</b>
<b>Bacteriófago</b>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Toxina eritrogénica
	<i>Escherichia coli</i>	Toxina Shiga-like
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterotoxinas A,D y E. Estafiloquinasa. Toxina TSST-1
	<i>Clostridium botulinum</i>	Neurotoxinas C, D y E
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina difterica
<b>Plásmidos</b>	<i>Escherichia coli</i>	Enterotoxinas LT y ST. Pilis (factores de colonización). Hemolisina. Ureasa. Factor de resistencia al suero. Factores de adherencia. Factores de invasión celular.
	<i>Bacillus anthracis</i>	Factor edema. Factor letal: Antígeno protector. Cápsula de ácido poli-D-glutámico.
	<i>Yersinia spp</i>	Factor de crecimiento intracelular. Factor de producción de cápsula.
	<i>Yersina pestis</i>	Coagulasa. Fibrinolisisina. Toxina Murina
<b>Transposón</b>	<i>Escherichia coli</i>	Enterotoxina ST. Sideroforos ?. Operones para hemolisina y pilis-x?
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Toxina Shiga?
	<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina colérica. Toxina ZOT. Toxina ACE

(J. Mekalanos. En Lederberg, 1992)

El descubrimiento de la base genética que codifica para factores de virulencia en los microorganismos patógenos, ha permitido establecer bases de actuación muy favorables en la medicina preventiva de las enfermedades infecciosas. Además de comprender a través de ellos el modo en que los microorganismos producen daño en el hospedador, permiten establecer diseños diferentes en los esquemas clásicos de elaboración de vacunas. Sin entrar en más detalles, el uso de cepas de virulencia atenuada como consecuencia de la inactivación específica de un gen o de varios genes implicados en la expresión de factores de virulencia, pueden sustituir con ventaja a los productos convencionales.

**El estudio e identificación de los factores de virulencia y de los genes que les codifican**, constituye uno de los objetivos más atractivos para los investigadores. En la actualidad, existen varios recursos para la identificación de un factor y de su soporte genómico. Técnicas de mutagénesis (sustancias químicas, radiaciones, transposones, etc.) capaces de suprimir el gen o genes implicados en la expresión de un factor de virulencia en estudio, permiten obtener mutantes defectivos en los mismos; el estudio comparado de estos mutantes respecto de la cepa salvaje en condiciones *in vitro* sobre las células diana cultivadas artificialmente o en modelos animales, en los que se prueban distintos efectos (en el caso de las células y de ordinario, capacidad de adhesión, de penetración o de destrucción), permite concluir acerca de la participación del factor en estudio en la patogénesis de la enfermedad; esto es, confirmar o rechazar su condición de factor de virulencia.

Las técnicas *in vitro* poseen en cualquier caso claras limitaciones, pues lo que sucede en el hospedador natural no siempre es fácil de reproducir, bien por falta de conocimiento de las condiciones de ambiente en las que se mueve el patógeno, o porque el grado del mismo resulta insuficiente. En relación con la adhesión

por ej., las células cultivadas pueden llevar en su superficie receptores sobre los que se fijan las bacterias que después son alteradas y distribuidas de modo diferente a como sucede en el caso de sus homólogas naturales, con lo que el modelo de estudio no refleja con fidelidad la adhesión de las bacterias a las membranas celulares *in vivo*. Otra limitación reside en el hecho de que no siempre se conoce la naturaleza exacta de las células que se infectan en el hospedador natural.

La gran cuestión es pues **identificar los genes** que sólo se activan en los tejidos del hospedador en las condiciones naturales de la infección, y cuyas condiciones de funcionamiento aún no se sabe cómo reproducirlas en el laboratorio. Para responder a este problema, los investigadores han sugerido que la activación de ciertos genes relacionados con la virulencia solamente tiene lugar como consecuencia de un estímulo ambiental, del entorno propio (por ej., una cierta temperatura o concentración de determinados iones). Para revelar los promotores que condicionan la activación del gen después de la invasión del hospedador, se utiliza un gen que sirve como revelador del funcionamiento del promotor. En el caso de *Salmonella typhimurium*, Mekalanos *et al.* (1992) trabajaron sustituyendo el gen *purA* implicado en la síntesis de las purinas, por una copia funcional del mismo que no está flanqueada por su promotor, sino por un fragmento cualquiera de ADN de *Salmonella*, entre cuyas secuencias se encuentran con seguridad promotores activos en el hospedador y con capacidad para activar a *purA*. Para comprobar que el gen de virulencia solo funciona en el hospedador, se incorpora un testigo *lacZ*, que codifica la enzima -galactosidasa fácilmente identificable, seleccionando así las cepas que son incapaces de fermentar la lactosa *in vitro*, pero que sí se recuperan del bazo de un animal (ratón) infectado. De este modo ha sido posible la identificación de varios genes de virulencia que solo se expresan en el hospedador infectado y que los modelos *in vitro* son incapaces de poner de manifiesto.

## **Adaptaciones y cambios microbianos motivados por la presión selectiva. Desarrollo de resistencias**

La expresión de resistencias frente a un agente microbiano causa de una enfermedad infecciosa, puede llegar a representar mayor riesgo para la salud pública incluso, que la aparición de una enfermedad nueva. La resistencia frente a los antimicrobianos o los pesticidas constituye un factor crítico en la emergencia de muchas enfermedades infecciosas. Todavía es preciso añadir que muchos genes de resistencia son en sí mismo móviles, son transposones con capacidad para pasar del cromosoma a un plásmido, de un plásmido a otro, etc.; a los transposones se les concede mucha importancia en la «recuperación» de los genes de resistencia en diferentes puntos del genoma de diversas bacterias. Se estima que entre transposones y plásmidos se justificarían hasta las 2/3 partes de los casos de resistencia (J.E.Davies, 1990).

La resistencia a los antibióticos es casi siempre el resultado de la presión selectiva. Ninguna droga es universalmente efectiva frente a todas las bacterias. Mediante estudios genéticos y bioquímicos ha podido demostrarse que la resistencia obedece a una mutación espontánea en uno de los genes de la bacteria, cuya consecuencia es bien la modificación del objetivo celular del antibiótico (por ej., es el caso de las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular) o bien se reduce el acceso por disminución del transporte del antibiótico a través de las envolturas externas de la bacteria. Otros tipos de modificación genética como es por ej., la duplicación o ampliación en un gen, también pueden producir resistencia al originar la sobreproducción de la «diana del antibiótico». Además, los plásmidos pueden transferir la resistencia entre bacterias, representando esta modalidad un papel primordial en la difusión de estas características.

Cuando se utiliza una droga eficaz, la emergencia de microorganismos resistentes, que tiene lugar siempre, se selecciona a partir de la población inicialmente susceptible. Existen ejem-

plos en prácticamente todos los grupos microbianos respecto de diversos agentes. Una excepción reconocida es *Treponema pallidum*, el agente de la sífilis humana, que continúa siendo igual de susceptible que siempre frente a la penicilina.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, han desarrollado en la actualidad también resistencias frente a las quinolonas. Igual ocurre con *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos nosocomiales Gram negativos.

*Streptococcus pneumoniae* requiere en la actualidad concentraciones muy altas de penicilina, y algunas cepas son también resistentes a muchos otros productos, dejando pocas opciones en el tratamiento. En el caso de estafilococos y enterococos están emergiendo en los últimos años cepas resistentes a vancomicina, por el momento la única droga eficaz en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y otros Gram negativos, que mediante mutación puede desarrollar resistencias que les permiten sobreproducción de lactamasas; igualmente pueden aparecer también resistencias al imipenem y otros carbapenemos mediadas por plásmidos. La naturaleza de la resistencia a la vancomicina está mediada por cinco genes situados en un mismo plásmido, dos de los cuales promueven la formación de un precursor de la pared diferente al normal, al que se fija el antibiótico con una afinidad mil veces más débil que en las cepas sensibles, lo que justifica la resistencia del microorganismo.

En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, según parece como consecuencia de ciertas mutaciones espontáneas, han aparecido cepas multirresistentes a las drogas, incluyendo isoniazida y rifampicina.

Como ya se ha señalado, la utilización masiva de antibióticos en producción animal, en el tratamiento de infecciones bacterianas de árboles frutales y en la clínica humana y animal, ha favorecido la selección de cepas resistentes, con la particularidad de que en

el caso de su uso en la alimentación animal, de ordinario la adición a los piensos se ha producido sin purificación previa, esto es que el producto iba por lo general contaminado con restos celulares de los organismos de procedencia, lo que en la práctica significa que a los animales se les ha venido suministrando con estas sustancias, los genes de resistencia correspondientes, igual que ha sucedido en el tratamiento de árboles frutales. El medio hospitalario por su parte, es particularmente propicio para la difusión de resistencias, hecho que resulta favorecido por la concentración de los enfermos. Además, en éste se produce simultáneamente una auténtica selección de bacterias resistentes a los antibióticos administrados.

### **Presión inmunológica:**

Puede ser el origen de cambios o pérdidas en antígenos críticos para la neutralización del microorganismo, lo que a su vez puede representar una ventaja del patógeno epidemiológicamente útil, respecto de una población susceptible. Así ocurre por ej., en el caso de los virus influenza, en los que la redistribución de hemaglutininas genera virus de composición antigénica distinta, que escapa a la respuesta inmune. Este mecanismo también participó probablemente en la evolución y adaptación al perro de los parvovirus felinos (Parrish, 1990).

## **6. Ruptura de las medidas y controles de salud pública.**

El control de muchas enfermedades infecciosas ha estado asociado a la mejora y avance de la sociedad como resultado de los logros conseguidos en medicina, ciencia y salud pública, dentro del concepto global de la moderna civilización.

Pese a la aparente seguridad que se observa en los países desarrollados, lo cierto es que solo protege a la clase humana una fina línea que la separa de las epidemias de enfermedades infecciosas devastadoras. Por separado o en combinación, el colapso

económico, la guerra y los desastres naturales entre otras causas sociales, han originado repetidas veces (y pueden volver a hacerlo) la ruptura de los controles de salud pública, permitiendo la emergencia o reemergencia de un gran número de enfermedades mortales.

## IDENTIFICACION Y LUCHA Y CONTROL

Existen dos procedimientos científicos principales y complementarios en la identificación de los problemas emergentes y en la respuesta a los mismos; por un lado la **vigilancia** y por otro la **investigación básica**. Un ejemplo de lo primero podría estar representado por las prospecciones que examinan serologías en el hombre o los animales y estudian la evolución de los modelos de enfermedades. En cada país, la investigación biomédica se desarrolla en Centros relacionados con la Administración Sanitaria. En los Estados Unidos son por ejemplo los NIH<sup>2</sup>, mientras que en España tendría su reflejo en el Instituto de Salud Carlos III. Este tipo de patógenos y las enfermedades por ellos producidas, probablemente constituyen la mejor justificación de la existencia de estos centros.

En 1993, clínicos, microbiólogos clínicos y expertos en salud pública de los Estados Unidos confrontaron un numeroso grupo de enfermedades infecciosas epidémicas y emergentes, tanto a nivel de aquel país como internacionalmente. En todas ellas se planteaban importantes cuestiones relacionadas con la epidemiología, patogénesis, diagnóstico, tipificación epidemiológica de los microorganismos, tratamiento y estrategias óptimas de prevención; además y con carácter general para todas, se aceptaba la necesidad de una rápida respuesta de salud pública.

En un informe elaborado en octubre de 1992 por el Instituto de Medicina de los Estados Unidos se incluían un total de 15 recomendaciones para la prevención y control de estas enfermedades, la mayoría de las cuales fueron objetivadas prioritariamente por el CDC<sup>3</sup> y el NIH; Tanto en una institución como en otra, microbiólogos, epidemiólogos y clínicos intervienen en el reconocimiento y control de los riesgos, para lo cual se requiere una colaboración estrecha que implica investigación, entrenamiento, formulación de estrategias de prevención y evaluación y educación pública.

CDC y NIH han desarrollado planes contra este tipo de infecciones en los que destaca una colaboración estrecha, además de conexiones con otros departamentos e instituciones internacionales (OMS, entre otras). El interés de estos planes, estructurados mediante objetivos, reside en su carácter extrapolable a otras regiones del mundo.

El Plan del CDC incluye cuatro objetivos primarios que representan prioridades para el incremento de la vigilancia, la investigación aplicada con integración de trabajos de laboratorio y epidemiológicos y el establecimiento de un programa de investigación exterior dirigido a prioridades en materia de salud pública. El plan propone el establecimiento de Centros de Epidemiología y Prevención de Infecciones Emergentes basados en los Departamentos de Salud, pero con la implicación de instituciones académicas y otras de carácter estatal. En resumen los objetivos incluyen:

1. **Vigilancia:** Detección, investigación rápida y monitorización de patógenos emergentes, las enfermedades producidas por ellos y los factores que influyen en su emergencia.

2. **Investigación aplicada:** Integración de la ciencia de laboratorio y la epidemiología para optimizar la práctica de la salud pública.

3. **Prevención y Control:** Incremento del intercambio de información en materia de salud pública acerca de las enfermedades emergentes y asegurar la rápida puesta en práctica de estrategias de prevención.

4. **Infraestructura:** Fortalecimiento a nivel local, estatal y federal de las infraestructuras de salud pública para permitir la vigilancia y poner en práctica programas de prevención y control.

El plan del NIH incluye cinco objetivos que se centran sobre investigación básica y aplicada y prioridades de adiestramiento para incrementar el conocimiento de los mecanismos de las enfermedades emergentes y para aumentar la propia capacidad de respuesta. En resumen:

1. Desarrollo de una **infraestructura** de investigación y entrenamiento capaz de responder de forma expeditiva a las emergencias de enfermedades infecciosas.

2. **Extensión** de la investigación básica y aplicada sobre los factores ecológicos y ambientales que influyen en la emergencia.

3. **Extensión** de la investigación básica y aplicada sobre los cambios microbianos y las adaptaciones que influyen la emergencia.

4. **Extensión** de investigación básica y aplicada sobre las interacciones de los hospedadores con los patógenos emergentes.

5. **Soportes** para el desarrollo y comprobación de las estrategias de control para las enfermedades específicas con potencial para la emergencia.

## PATOGENOS EMERGENTES Y ZONOSIS

Hughes y La Montagne (1994) han identificado a nivel internacional ejemplos incuestionales de enfermedades emergentes. En este campo, los animales representan papeles muy diversos, estableciendo en muchos casos un punto de comunidad que constituye el refugio natural para muchos patógenos humanos. Son casos de verdaderas zoonosis, en los que los animales o sufren clínicamente la infección o actúan como reservorios inaparentes de estos agentes.

Desde nuestro punto de vista, los microorganismos patógenos emergentes que causan zoonosis de interés principal incluyen al menos dentro del capítulo de las bacterias: *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Borrelia burgdorferi*, *Rochalimaea henselae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, y dentro de los virus el virus rábico, los hantavirus responsables de neumonía, y el virus de la fiebre de Ebola-Marburgo.

### I. BACTERIAS

#### *Escherichia coli* 0157:H7

*Escherichia coli* 0157:H7 se viene reconociendo desde 1982 (Riley *et al.*, 1983) como una causa importante de enfermedad humana, implicado en brotes que se han asociado al consumo de carne de vacuno picada insuficientemente cocinada, al consumo de leche no pasteurizada, etc., casi siempre en centros escolares o guarderías infantiles (Carter *et al.*, 1987; Ostroff *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1983), donde la transmisión fecal-oral entre los niños no es una situación rara.

Además de en los Estados Unidos e Inglaterra, también se han descrito brotes en otras partes del mundo, en algunos de cuyos lugares como es el caso de ciertos países de Sudamérica constituye un problema grave entre las poblaciones de niños menores de cuatro años de edad (Lerman *et al.*, 1992; Loirat *et al.*, 1984; Cordovéz *et al.*, 1992).

En su conjunto, los episodios que tuvieron lugar en los estados norteamericanos de Washington, Idaho, Nevada y California entre 1992 y 1993, asociados por lo general a comidas rápidas tipo hamburguesa insuficientemente cocinadas, elaboradas a partir de carne de ganado bovino por la misma cadena de restaurantes, han sido con mucho los más importantes (CDC, 1993); los brotes contabilizados produjeron más de 700 casos, de los que por encima de 60 evidenciaron un grave síndrome urémico hemolítico y 4 personas fallecieron. Una particularidad que se puso de manifiesto en estos casos, fue la escasa presencia microbiana en las muestras, pues por lo general el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) no superaba 15 por gr, lo que pone de manifiesto una dosis infecciosa muy baja. Por otra parte, los recuentos de *Escherichia coli* (indicador) oscilaban desde menos de 10 a 700 UFC por gr., poniendo así de manifiesto el deficiente comportamiento del indicador respecto de la presencia del 0157:H7. Se puede considerar que en los últimos años la frecuencia de descripción de brotes por este microorganismo va en aumento, lo que bien puede reflejar o un aumento relativo del interés del asunto para los investigadores y consecuentemente mayor número de trabajos, o bien responder a un aumento real de la incidencia y difusión geográfica del agente (Griffin *et al.*, 1991).

*Escherichia coli* 0157:H7, se reconoce también como *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC). Aunque con rigor esta denominación también se aplica a algunos otros serotipos, este es siempre el más frecuente y en la práctica el más importante.

Produce tres tipos de síndromes clínicos muy graves: colitis hemorrágica, síndrome urémico-hemolítico y púrpura trombocitopénica trombohepática. En el primero de ellos, aparecen inicialmente dolores tipo cólico, de enorme intensidad, que van seguidos de diarrea sanguinolenta copiosa, que tiñe las heces (en ocasiones pueden medirse varios gramos de sangre en las heces); No hay fiebre, pero pueden haber vómitos y aproximadamente un 5% de los pacientes progresan hacia el cuadro urémico hemolítico, de muy graves consecuencias. Es habitual la aparición súbita de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal, aproximadamente una semana después de la diarrea o de la colitis hemorrágica. Tanto la colitis como la nefropatía se asocian con cambios microangiopáticos característicos en el intestino y riñones respectivamente. Existe la sospecha de que la microangiopatía trombótica es el resultado de un daño selectivo en el endotelio vascular originado por toxinas SLT (ver después) circulantes. Recientemente se ha demostrado *in vitro* que estas toxinas se unen a receptores glicolípidos del fenotipo P de los glóbulos rojos humanos. Niños y ancianos son por lo general sujetos habituales de este proceso. En algunos casos se producen lesiones a nivel del SNC, que son origen de crisis convulsivas, pudiendo llegar al coma y conducir finalmente a la muerte. Por lo general, las complicaciones del SNC son un importante factor predictivo de la mortalidad en el síndrome urémico-hemolítico.

La púrpura trombocitopénica trombohepática es muy rara, con un cuadro clínico parecido al anterior, al que se suman los síntomas derivados de la presencia de coágulos en el encéfalo. En este caso, no existe preferencia de edad o tipo de individuo.

*Escherichia coli* 0157:H7 coloniza el ileon terminal, el ciego y el cólon de animales de experimentación, produciendo un tipo de lesión muy semejante a la que se observa en ciertas cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno, caracterizado por a modo de rasguños de los microvilli del epitelio intestinal, con unión íntima

de la bacteria a la membrana plasmática de la célula hospedadora y reclutamiento de elementos del citoesqueleto celular, incluyendo filamentos de actina, que forman basamentos de adhesión electrodensos. En la patogénesis de la lesión principal, que termina con la necrosis del epitelio, rotura de vasos y salida de sangre a la luz intestinal, se responsabilizan directamente las toxinas producidas por este microorganismo.

*Escherichia coli* 0157:H7 produce algunas toxinas realmente muy potentes. Ratones inoculados con sobrenadantes filtrados de cultivos, manifiestan al tercer día parálisis de las extremidades posteriores, con dificultad respiratoria y finalmente muerte; el mismo efecto puede observarse también en conejos. Las toxinas son citotóxicas para ciertos cultivos celulares y enterotóxicas en asa ligada de ileon de conejo.

Entre las toxinas producidas por este microorganismo se incluyen dos tipos de verotoxinas o SLT (*Shiga Like Toxins*) numeradas I y II, que sin duda son factores principales, a los que se suman otras sustancias menos importantes en la patogenia.

La SLT-I es esencialmente idéntica a la toxina de Shiga elaborada por *Shigella dysenteriae* tipo 1. La SLT-II fué diferenciada inicialmente de la SLT-I por la incapacidad de sueros policlonales anti-toxina Shiga, para inhibir su actividad tóxica. Posteriormente, los análisis de secuencias de DNA mostraron que los genes estructurales para SLT-II poseen una homología del 58% con los de la SLT-I (Jackson *et al.*, 1987).

Aunque los dos tipos de toxinas son antigénicamente distintos, mantienen varias características comunes importantes, como: 1) ambas son holotoxinas, constituidas por una subunidad A simple, enzimáticamente activa, que está unida de modo no covalente con un pentámero de subunidades B, que se unen al receptor; 2) ambas parecen unirse al mismo tipo de receptor en la superficie de las células, un glicolípido denominado globotriosilceramida

(Gb<sub>3</sub> que constituye el antígeno Pk); 3) ambas actúan como N-glicosidasas altamente específicas e inhiben la síntesis proteica en los ribosomas eucariotas, al liberar un residuo específico de adenina en el rRNA 28S de la subunidad ribosómica de 60S.

En estudios llevados a cabo sobre cepas de origen clínico de diversas procedencias geográficas ha podido establecerse que de ordinario las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 producen ambos tipos de toxinas o solamente SLT-II. En aquellos pacientes de los que se aislaron cepas que solo producían SLT-I, la gravedad del cuadro clínico era sustancialmente menor.

Las cepas de *Escherichia coli* 0157:H7 son lisogenizadas por uno o más bacteriófagos que codifican los genes estructurales para las toxinas. Las cepas toxigénicas portan un plásmido que se asocia con la expresión de una nueva variedad de fimbrias que favorecen la unión de estas bacterias a las células hospedadoras (Karch *et al.*, 1987) y la expresión de una proteína de membrana externa de 102 kDa, codificada por un gen cromosómico (gen *eae*) que sustancia la unión íntima a las células intestinales (Tzipori *et al.*, 1987); estudios recientes sugieren que el gen *eae* es común entre los aislamientos clínicos de origen humano y significativamente menos común entre los aislamientos procedentes de ganado sano, por lo que se ha pretendido relacionarle con la virulencia de este serotipo de *Escherichia coli* (Barret *et al.*, 1992). Algunas otras características específicas de este serotipo incluyen la formación de cápsula a 25°C y la producción de enterohemolisina. Estas cepas, cuando son inoculadas oralmente, producen la muerte de ratones tratados con estreptomycinina (Bentin *et al.*, 1989).

**Tabla 5.**  
**Caracteres de las verotoxinas de *E.coli* 0157:H7**

<b>Característica</b>	<b>SLT-I</b>	<b>SLT-II</b>
Naturaleza	Proteica	Proteica
Peso molecular kDa	70	88'5
Subunidades	1A:5B	1A:5B
Peso mol. subunidades	A:32 B:7'7	A:35-33'135 B:10'7-7'817
Codificación	Fagos temperados	Fagos temperados
Receptores celulares	Glucolípidos (Gb3)	Glucolípidos (Gb3)
Actividad intracelular	ARN glicosilasa e inhibición síntesis proteica celular	ARN glicosilasa e inhibición síntesis proteica celular
Actividad enterotóxica en		
RILT	moderada	moderada
IMT	no	no
Actividad neurotoxica y letal en ratones	Si	Si
Líneas celulares sensibles	Vero y HeLa	Vero y HeLa
Neutralización		
Antisuero Shiga	Si	No
Antisuero SLT-II	No	Si

Gb3: globotriosilceramida; RILT: «Rabbit Ileal Loop Test»;  
IMT: «Infant Mouse Test»

*Escherichia coli* 0157:H7 posee una tolerancia especial a los ácidos que le distingue, siendo esta característica particularmente notable si se combina con temperaturas de refrigeración. La circunstancia, que es aplicable (al menos en condiciones experimentales) a diversos tipos de sustancias (ácido acético, cítrico, láctico, etc.) posee gran importancia práctica en lo que a las condiciones naturales de muchos alimentos en conservación se refiere. Por ej., en un brote en el que se implicó sidra de manzana que mantenía un pH entre 3'6 y 4, se pudo demostrar supervivencia del microorganismo a una temperatura de conservación de 8°C, durante periodos de 1 mes y superiores. Algo parecido ocurre con la mayonesa, que mantiene también de ordinario valores de pH entre 3'6 y 4 y en la que también con ocasión de un brote en los Estados Unidos (Doyle, 1994) se probaron periodos de supervivencia de casi dos meses cuando se mantenía el producto a temperatura de refrigeración (5°C), mientras que a temperaturas ambientales (aproximadamente 20°C) la supervivencia se prolonga durante periodos de hasta 3 semanas.

En relación con los reservorios animales, Wells *et al.*, (1991) han demostrado que el ganado bovino es el reservorio principal del 0157:H7, lo que justificaría su presencia en la carne o en la leche procedentes de esta especie animal. Numerosos autores han referido además el aislamiento del microorganismo a partir de las heces de esta especie, tanto con diarrea como sin ella (Chanter *et al.*, 1986; Mainil *et al.*, 1987; Orskov *et al.*, 1987; Schoonderwoerd *et al.*, 1988; Sherwood *et al.*, 1985; Wells *et al.*, 1991; Montenegro *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1986). Los animales colonizados por el serotipo 0157:H7 en la mayoría de los estudios no superan sin embargo, el 2% de los animales muestreados. Blanco *et al.* (1995) han estudiado en Galicia la importancia de la presencia de estos serotipos en el ganado bovino, concluyendo que el 29% de los serotipos aislados a partir de esta especie, incluía tipos enterohemorrágicos. En el ganado ovino, caprino, en perros y gatos, también se han encontrado cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicas

## *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son de entre sus congéneres y especialmente el primero, prácticamente los responsables de la totalidad de los casos de enteritis por *Campylobacter*, un tipo de enterocolitis aguda muy difícil de diferenciar de otras gastroenteritis agudas, que manifiesta fiebre alta, dolor abdominal intenso y diarrea, que suele prolongarse por espacio de 2-3 días. El aspecto de las heces no es patognomónico, pues de ordinario suelen tener una apariencia acuosa, a veces viscosa, en ocasiones sanguinolentas, pero siempre con un olor fuerte, nauseabundo, extremadamente desagradable. La presencia de vómitos es rara.

Los casos de enteritis por *Campylobacter* son numerosos en todos los países, prácticamente siguiendo en incidencia a los producidos por *Salmonella* y ello tanto en países en desarrollo como en países desarrollados. Las poblaciones más afectadas incluyen niños menores de 14 años, seguidos por jóvenes de entre 14 y 18. En cualquier caso, la mayor incidencia estacional se presenta en los meses calurosos del verano. Como en el caso de otros emergentes, los hábitos alimentarios, especialmente las comidas rápidas, poco hechas, particularmente a base de pollo o derivados, se consideran una causa importante de la actual casuística. Según Hernández Haba, si en nuestro país se extrapolaran cálculos realizados en el Reino Unido, deberíamos presentar del orden de 400.000 casos al año, lo que supondrían unas pérdidas del orden de 20.000 millones de pesetas (a razón de una media de 50.000 pts por caso, contabilizando no solamente gastos directos como hospitalización, tratamiento médico, etc., sino también las cuantiosas repercusiones indirectas que se implican en los enfermos).

Se consideran reservorios diverso tipo de animales, también el agua y algunos seres humanos. En el caso de los primeros, son las aves las más importantes, pues *Campylobacter jejuni* se

aisla sin problemas del contenido intestinal, lo que facilita durante el sacrificio y manipulación de la canal, la contaminación de esta. Le sigue en importancia el ganado bovino, en el que la contaminación de las canales, no obstante no se produce con tanta facilidad; la leche sin pasteurizar puede ser un vehículo importante, aunque su presencia no puede concluirse necesariamente del aislamiento del tracto intestinal, estando ligada a la contaminación fecal durante el ordeño, o bien a la existencia de una mamitis específica. El ganado porcino alberga especialmente *Campylobacter coli* (aunque sin que ello excluya al otro), que se aísla con frecuencia de la vesícula biliar y colédoco.

Los alimentos de origen animal, especialmente carne de pollo, carne de bovino y leche, han sido implicados en brotes de la enfermedad; casi siempre ligado su consumo a una inadecuada preparación culinaria, que permitió la supervivencia del agente. Los derivados cárnicos, especialmente hamburguesas, mariscos, etc., son vehículos habituales

De todo tipo de aguas ha sido posible el aislamiento de *Campylobacter jejuni*, a donde accede a partir de las heces de los animales. Aunque a temperaturas bajas sobrevive varias semanas, a 20°C la supervivencia no va más allá de dos días. Además, una ventaja está representada por la ausencia de multiplicación fuera del hospedador animal (no crecen a menos de 30°C y además son microaerófilos y capnófilos, con un tiempo de generación en condiciones óptimas del orden de 1 h).

Los reservorios humanos están representados por individuos que fueron afectados en su edad infantil por el microorganismo, permaneciendo como portadores.

### **Listeria monocytogenes.**

Ha representado en los últimos años uno de los motivos de estudio e investigación más atractivos. Aunque hace tiempo que se venía sospechando la participación de los alimentos en el con-

tagio humano por *Listeria monocytogenes*, no fué hasta los años 80 y 90, con ocasión de diversos brotes de la enfermedad, que tuvieron lugar en Canadá (Nueva Escocia), Estados Unidos (Massachusetts, California y Philadelphia), Suiza (Vaud), Francia (Limousin, Alsacia, Vendée, Ile de France y Normandía), Inglaterra (Londres), que pudo demostrarse de modo irrefutable dicha relación mediante el estudio de casos-control, en el que la misma cepa (isovariedad, fagovariedad) fué aislada tanto de los alimentos consumidos por los enfermos, como de los propios enfermos.

Del interés actual por este agente y la enfermedad consiguiente son buena prueba la atención que los organismos nacionales e instituciones internacionales le han venido prestando en los últimos años. En León se celebró a finales de 1992 una Conferencia-Consenso con el tema específico de Listerias en Alimentos, y la ICMSF<sup>4</sup> ha dedicado en varias de sus reuniones, sesiones específicas a esta cuestión.

Desde el punto de vista humano y en relación con los alimentos, solo posee interés *Listeria monocytogenes*, la primera especie descrita y especie-tipo del género *Listeria*. Son estos microorganismos bacilos o cocobacilos Gram positivos, mesófilos, aerobios y anaerobios facultativos, que crecen bien en los medios de cultivo y a los que la sangre y glucosa favorecen de modo evidente. Es importante que son capaces de crecer entre 4 y 40°C y entre pHs 6 a 9, aunque soportan mal los valores ácidos.

*Listeria monocytogenes* además del hombre puede afectar a un gran número de especies, originando cuadros de elevada mortalidad que incluyen encefalitis y/o meningitis, abortos e infecciones generalizadas.

*Listeria monocytogenes* no es un tipo de microorganismo especialmente virulento. La DL<sub>50</sub> en el ratón es inferior a 10<sup>6</sup>, siendo de 10<sup>8-9</sup> en el caso de las listerias avirulentas. Además de la DL<sub>50</sub>, son utilizables con el mismo fin los estudios de supervi-

uencia y multiplicación en bazo e hígado, que ponen de manifiesto la persistencia de las cepas virulentas, o la inoculación en membrana corioalantoidea o saco vitelino, en los que las cepas virulentas proporcionan DL<sub>50</sub> del orden de 10<sup>2-4</sup>.

Las cepas de los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, son responsables de la mayoría de los casos; especialmente los primeros se implican en la transmisión por alimentos, y algunos en especial como los pertenecientes al fagovar «epidemiógeno», se han responsabilizado de distintos brotes en California, Suiza, Dinamarca o Francia.

Hoy sabemos que *Listeria monocytogenes* posee un cuantioso arsenal de factores de virulencia que le permiten no solo sobrevivir, sino también multiplicarse, tanto en células fagocíticas como en no fagocíticas. En este sentido, la listeriolisina O es una citolisina tiol-activada, de 60 kDa, principal responsable de la hemólisis y que actúa rompiendo las membranas lisosomales permitiendo el escape del fagosoma y con ello la multiplicación intracelular. Además, una fosfolipasa C de 29 kDa, está igualmente relacionada con la rotura del fagosoma, degradando también diverso tipo de fosfolípidos de membrana; esta actividad se relaciona con la infección célula-célula. Otras sustancias, incluyendo una segunda fosfolipasa, una metaloproteasa de Zn, una proteína de superficie, etc., se implican también en la virulencia.

**Tabla 6.**  
**FACTORES DE VIRULENCIA DE LISTERIA**

FUNCION	FACTO DE VIRULENCIA
Adherencia e invasión	* internalinas * proteínas de superficie p60 y actA
Multiplicación intracelular (ruptura del fagosoma)	* listeriolisina O * fosfolipasa C/lecitinasa + metaloproteasa * fosfolipasa C/fosfatidilinositol * esfingomielinasa C
Movimiento intracelular	* proteína de superficie actA
Supervivencia intrafagosómica	* catalasa, superóxido dismutasa
Agentes endotóxicos y moduladores de la respuesta inmune	* sustancias LPS-like (ác. lipoteicoicos) * actividad productora de monocitosis * actividad inmunosupresora * antígeno de superficie
Adquisición de hierro	?
Regulación genética de la virulencia	* factor regulador positivo * factores reguladores negativos

(Recopilado de varios autores por Vázquez, 1993)

La ingestión de alimentos contaminados es un procedimiento ordinario de contagio. Desde el intestino y por vía hemolinfática accede al hígado y bazo. *Listeria monocytogenes* se libera al intestino a través de la bilis.

En el desarrollo de un suceso clínico, además de los factores de virulencia mencionados, influyen también otros hechos o circunstancias dependientes del hospedador, y que justifican los denominados grupos de riesgo. La gestación por ejemplo, produce una depresión inmune de base celular a nivel de la placenta, además de la correspondiente inmunodepresión generalizada, por actuación a nivel de la actividad celular dependiente de los  $T_H$ . Los tratamientos inmunodepresores a base de corticosteroides, ciclosporina A, carragenina y otros moduladores, incrementan con claridad la tasa de casos de listeriosis. Los tratamientos antiulcerosos, diabetes, alcoholismo, colitis ulcerosa, cirrosis hepática, trasplantes, enfermedades sistémicas, insuficiencia renal crónica, etc., etc., también se relacionan con la presencia de listeriosis. Igualmente, las edades extremas (niños y ancianos) son por lo general mas susceptibles.

Epidemiológicamente *Listeria monocytogenes* se caracteriza por su ubicuidad, sobreviviendo en el suelo en función de la temperatura hasta 500 días en tierra húmeda. En heces o en residuales mantenidas experimentalmente a temperatura de refrigeración, sobrevive mas de 6 años, reduciéndose hasta mas de un año a temperatura ambiental.

*Listeria monocytogenes* se multiplica a temperatura de refrigeración, incluso entre 0 y 4°C, relacionándose esta característica con el pH (a pH 6 las tasas de multiplicación son más altas que a pH 5). *Listeria monocytogenes* sobrevive a tratamientos térmicos de 61'7°C durante 35 minutos, a 78°C durante 15 segundos (a concentración  $> 10^5$  UFC/ml) sucumbiendo con seguridad a temperaturas por encima de 73°C, por lo que se ha definido como un microorganismo «débilmente termorresistente». *Listeria monocytogenes* se multiplica a valores de pH entre 5 y 9, siendo límites los valores de 4'5 y 9'5, lo que le permite sobrevivir la fermentación que tiene lugar en ciertos derivados cárnicos o lác-

teos, aunque en la práctica no se observa multiplicación y puede promoverse la inhibición mediante el efecto sinérgico con otros factores.

*Listeria monocytogenes* tolera y se multiplica a concentraciones del 10% de ClNa, sobreviviendo incluso a concentraciones del 20-30%, con supervivencias de 1 año en un 16% de ClNa. Este parámetro se interrelaciona con pH y temperatura (aumenta la tolerancia al disminuir la temperatura). El nitrito sódico, a las concentraciones habituales (100-150 ppm en los alimentos) no inhibe la bacteria, aunque esto puede conseguirse mediante el efecto sinérgico de la temperatura (5°C), acidez (pH 5'5), ClNa (4-4'5%), condiciones de anaerobiosis, etc. *Listeria monocytogenes* sobrevive a valores de  $a_w$  del orden de 0'83 (leche condensada) durante 42 días, pero valores de 0'6 o inferiores (leche en polvo) garantizan su inhibición al cabo de 16 semanas.

Existen en la naturaleza un alto porcentaje de reservorios de *Listeria monocytogenes* que eliminan el microorganismo por las heces. En un estudio realizado por Ralovich en 1987, quien revisó la literatura aportada por numerosos investigadores, la frecuencia conjunta era del 3'78% , con valores máximos extremos del 69'2% (cit. por Kampelmacher) o del 91'6% (cit. por Ortel). Gómez Mampaso en España (1993) ha ofrecido para los varones adultos cifras del 18%, que se elevan al 31% en las mujeres embarazadas, y hasta el 75% si se consideran aquellas que tuvieron niños con listeriosis. Entre los animales, Ralovich (1987) encontró cifras del 14% en ovejas y del 27'2% en cabras.

Desde las heces, *Listeria monocytogenes* contamina los alimentos de origen animal o vegetal. Incluso puede suceder que en el caso de la leche, ésta se obtenga ya contaminada (mamitis). El consumo de alimentos contaminados es la causa más común de difusión, aunque también pueden haber otros, incluyendo la transmisión vertical.

La incidencia de listeriosis es un dato que adolece de la falta de información generalizada (no es enfermedad de declaración oficial en la mayoría de los países). Según Ralovich (1987) y Rocourt (1990), las tasas por millón de habitantes más altas se dan en Alemania y Francia (3'4 y 3'3% respectivamente) ó en USA y Nueva Zelanda (7'4 y 7'3% respectivamente). La estimación de autores españoles sobre la incidencia en nuestro país (1976 y 1990) oscila entre 19 y 30 casos/año.

Como se ha dicho, el consumo de alimentos es la causa más frecuente de brotes de listeriosis humana. En Halifax (Nueva Escocia, Canadá) en 1981 un brote por consumo de ensalada de coles comercializada, afectó a 41 personas con un porcentaje de mortalidad del 27% entre los recién nacidos afectados. Entre junio y agosto de 1983, tuvo lugar en USA un brote que afectó a 49 personas, con un porcentaje de mortalidad del 29%, por consumo de leche pasteurizada, probablemente contaminada después del saneamiento. El consumo de queso fresco, tipo mejicano, fué la causa en 1985 de un gran brote que afectó a 142 personas, con un porcentaje de mortalidad del 63% entre los casos neonatales y fetales. Otro gran brote tuvo lugar en Suiza (afectó a 122 personas), implicándose el consumo de queso blando. En los últimos años, en 1992 tuvo lugar en Francia un brote por consumo de lengua de cerdo en gelatina, que arrojó un total de 279 casos, 63 muertes y 22 abortos. Otros alimentos implicados en brotes importantes han sido el paté (Reino Unido, entre 1987 y 1989, con más de 300 casos), los rilletes franceses, etc.(Tjomb 1993)

**Tabla 7.**

**BROTOS PRINCIPALES DE LISTERIOSIS TRANSMITIDA POR ALIMENTOS**

LUGAR	AÑO	Nº CASOS	% MORTALIDAD(*)	ALIMENTO	SEROTIPO
Canadá (Halifax)	1981	41	27(*)	Ensalada de coles	4b
USA (Boston)	1983	49	29(*)	Leche pasteurizada	4b
USA (Los Angeles)	1985	142	63(*)	Queso Blando	4b
Suiza (Vaud)	1983-87	122		Queso Blando	4b
Reino Unido	1987-89	300		Paté	
Francia	1992	279	22'58	Lengua de cerdo en gelatina	4b
Francia	1993	25	8(*)	Rillettes	4b

(\*): recién nacidos

***Aeromonas hydrophila***

Constituye una de las cuatro especies en las que fué integrado el género *Aeromonas* en 1984, tres de las cuales venían clasificadas como mesófilas y móviles y una más psicrófila e inmóvil, aunque en los últimos años han sido descritas un buen número de especies nuevas. En el primer grupo se sitúa nuestro microorganismo. Para las primeras se ha descrito el medio acuático como su hábitat primario, aunque también se aíslan de intestino y superficie de los peces. Igualmente diversos mamíferos sanos (ganado bovino, ovino y porcino) son portadores y eliminadores fecales de estos microorganismos.

*Aeromonas hydrophila* puede infectar y producir brotes de enfermedad en un amplio rango de especies animales, incluyendo peces y entre los primeros el hombre. En los peces produce septicemia hemorrágica, un tipo de situación clínica en la que el carácter de patógeno oportunista se asocia a estados de estrés, aunque en otras ocasiones posee el carácter de un patógeno primario. En el hombre, procesos como infecciones de heridas, endocarditis, peritonitis, gastroenteritis, etc., se asocian a menudo con microorganismos de este grupo, y en el caso de *Aeromonas hydrophila* se ha venido denunciando en los últimos años como un patógeno entérico de interés creciente, aunque no todas las opiniones se manifiestan con unanimidad y para un resto de microbiólogos, este papel resulta discutible.

*Aeromonas hydrophila*, como otras especies del grupo, justifican su patogenicidad a la posesión de determinados factores de virulencia entre los que se incluye un LPS peculiar, así como una lámina externa denominada lámina S que está compuesta por una proteína de 52-58 kDa de peso molecular y cuya presencia se relaciona con una elevada virulencia y resistencia a la actividad bactericida del suero.

Los de mayor interés en relación con la virulencia son, sin embargo, factores solubles, que se excretan al exterior de la bacteria y que contribuyen a la patogenicidad en el medio natural (hospedador); en este sentido se consideran por ejemplo una  $\alpha$ -hemolisina, proteína de 49-54 kDa, responsable de un halo de hemólisis completa que se observa en placas de agar sangre, con diferencias según las cepas, aunque inmunológicamente relacionadas. Estas sustancias producen poros de 93 Å de grosor, que rompen la membrana de los eritrocitos. La  $\alpha$ -hemolisina produce hemólisis parcial en placas de agar sangre, tiene carácter de proteína de 65 kDa de peso molecular y no se expresa a temperaturas superiores a 30°C. Recientemente se ha descrito una nueva hemolisina, también de tipo  $\alpha$ , que produce hemólisis incompleta

en eritrocitos de trucha, de 68 kDa de peso molecular y estable al calor (resiste 60°C durante 10 min.).

Aunque existe controversia acerca de la funcionalidad de las hemolisinas en relación con la patogenicidad de *Aeromonas hydrophila*, -hemolisinas procedentes de cepas humanas y de procedencia ambiental manifiestan actividad enterotóxica y citotóxica; además, mutantes isogénicos deficientes en esta actividad, manifiestan DL<sub>50</sub> dos ciclos logarítmicos superiores a la cepa parental.

Además de la actividad enterotóxica ligada a la -hemolisina, muchas cepas producen otro factor enterotoxigénico, una enterotoxina citotónica, de unos 15 kDa de peso molecular, que induce acumulación de fluido en asas ligadas de íleon de conejo, redondeamiento de células adrenales Y1 e incremento de los niveles de AMPc intracelular, para la que se ha señalado cierta relación inmunológica con la toxina colérica, relacionados con homologías demostradas mediante ensayos de hibridación.

La mayor parte de las cepas producen al menos dos proteasas; una es una metaloproteasa de 35 kDa y la otra es una serinproteasa de 68 kDa. No puede descartarse sin embargo, la presencia de alguna actividad más de este tipo y de hecho algunos autores han señalado la presencia de 3, 4 e incluso 5 proteasas dentro de las exosustancias de *Aeromonas hydrophila*. Su relación con la virulencia se ha demostrado a partir de mutagénesis con el transposón Tn5, en la que se ha observado aumentos de la DL<sub>50</sub> hasta casi dos ciclos logarítmicos en el caso de los mutantes deficientes, respecto de la cepa parental. Se ha sugerido que las proteasas intervendrían en los momentos iniciales de la enfermedad, proporcionando nutrientes a las bacterias y escapando a los mecanismos primarios de defensa humoral.

*Aeromonas hydrophila* produce fundamentalmente amonabactina, un tipo de sideroforo que permite la captación de compuestos férricos del hospedador, inasequibles directamente

para las bacterias. Aunque la relación con la virulencia no está muy clara, mutantes deficientes poseen una virulencia reducida en modelos experimentales respecto de las cepas parentales.

Estos microorganismos son capaces de crecer entre 4 y 42°C, soportando bien la congelación. Toleran entre un 0-6% de ClNa (según el habitat de procedencia) y son muy sensibles a la irradiación.

Su presencia en alimentos se condiciona a su contaminación a partir de portadores fecales, de los que las cifras más altas se obtienen en el caso de aves y ganado vacuno. Las canales de estas especies y aún las de cerdo y ovino se contaminan a partir de restos de procedencia intestinal, y entre los productos cárnicos, los frescos (carne picada) o en las primeras etapas de maduración en el caso de los embutidos, resultan del mayor riesgo. También han de considerarse el paté, etc.

Pueden aislarse de leche cruda pero raramente de productos lácteos pues tanto la pasteurización como la fermentación láctica les inhiben con facilidad. También se aíslan de pescado, mariscos y vegetales en los que pueden alcanzar alta incidencia.

### ***Borrelia burgdorferi*. ENFERMEDAD DE LYME**

*Borrelia burgdorferi* produce la enfermedad de Lyme (una ciudad del estado de Connecticut, en los Estados Unidos), una espiroquetosis multisistémica que en los últimos años ha alcanzado gran importancia en algunas zonas de los Estados Unidos, siendo igualmente un problema muy importante también en otras regiones del mundo, particularmente en el norte de Europa y Asia.

Los microorganismos responsables de la enfermedad son miembros del género *Borrelia* y en principio fueron agrupados en la especie *Borrelia burgdorferi* «sensu lato» (Burgdorfer, W. *et al.*, 1982; Johnson, *et al.*, 1984). Un obstáculo práctico al control de

la enfermedad deriva de la diversidad de cepas de este microorganismo. Recientemente varios investigadores de forma múltiple e independiente han propuesto la diferenciación de esta especie en tres o más, incluyendo a *Borrelia garinii*, que se asocia con los síndromes extradérmicos neurológicos y cardíacos que se ven en Europa y *Borrelia afzelii*, primeramente denominada grupo VS461, que incluye las borrelias asociadas con el síndrome cutáneo de *eritema migrans* o acrodermatitis crónica atrófica que se observa también entre los pacientes europeos. Por acuerdo, cualquiera de las tres especies se considera en la actualidad responsable de la denominada **Enfermedad de Lyme**.

*Borrelia burgdorferi* se transmite por las garrapatas del género *Ixodes*, habiéndose implicado hasta la fecha diversas especies como *Ixodes scapularis* ó *Ixodes pacificus*. Varios animales, incluyendo los ratones, pequeños mamíferos como ardillas, conejos, ratas, cricetos, perros, etc, pueden actuar como reservorios naturales. Solo las hembras se alimentan de sangre de un animal o del hombre, infectándose entonces con la espiroqueta, que se multiplica en el intestino de la garrapata pudiendo transmitirse a un nuevo hospedador cuando el ácaro durante la siguiente ingesta, regurgita una parte del contenido de su intestino.

La enfermedad comienza típicamente con una lesión de piel eritematosa, en forma de mancha rosada «*eritema migrans*» que en algunos pacientes progresa hasta la acrodermatitis crónica atrófica. Otras manifestaciones incluyen síndromes neurológicos, cardíacos o articulares. La enfermedad conduce con frecuencia a anomalías del sistema nervioso, con alteraciones de la barrera que representa el líquido cerebroespinal en el que se descubre la presencia de anticuerpos.

A causa de su gravedad y su expansión en los Estados Unidos, la enfermedad es un grave motivo de preocupación, aceptándose que se trata de la enfermedad transmitida por garrapatas

de mayor importancia en la actualidad. Desde 1982, cada año se ha doblado el número de casos, con más de 9.000 registrados por ej., en 1989. En otros países, como es el caso de Francia, la incidencia también es alta (mas de 1.000 casos anuales). En España, la enfermedad de Lyme ha sido estudiada en diversas encuestas serológicas, particularmente en La Rioja, Canarias, Madrid, Andalucía, Valladolid, Barcelona, La Coruña y Soria, con porcentajes medios de positividad del 9'8% y presencia preferente en colectivos que mantienen contacto repetido con animales domésticos: ganaderos, veterinarios, agricultores, etc.

En los Estados Unidos, recientemente se ha propuesto el uso del ciervo de cola blanca como un animal centinela en los programas de vigilancia epidemiológica (Gill *et al.*, 1994).

Un problema importante del control de esta borreliosis reside en los problemas que se derivan para el aislamiento o detección directa del agente en material procedente de los fluidos corporales o de las biopsias, razón por la que además del trabajo que se realiza para la disponibilidad de sondas y PCR, la mayor parte de las investigaciones han venido descansando en el estudio de la inmunidad humoral, particularmente mediante la aplicación de métodos como la inmunofluorescencia, ELISA e inmunobloting, utilizando por lo general como antígenos lisados de células enteras. El problema de estos lisados es que contienen gran número de proteínas en las que residen epítomos que producen reacciones cruzadas con otros microorganismos.

La respuesta temprana en la infección natural, se dirige habitualmente frente a la flagelina y las proteínas de superficie. Recientemente se ha demostrado que la región variable de la flagelina representa un antígeno específico de *Borrelia*. Mas tarde en el curso de la enfermedad, aparecen otro tipo de anticuerpos que se dirigen frente a proteínas estructurales, como la p100, que parece constituir un marcador del estado tardío de la enfermedad. Rasiah

*et al.* (1994) ha construido mediante ingeniería genética una proteína híbrida que incluye la región variable de la flagelina (un fragmento de 18 kDa que representa un antígeno temprano) y parte de la molécula de esta proteína estructural (83 kDa), que contiene la mayoría de los epítomos inmunodominantes de la proteína y que en condiciones naturales constituye un antígeno de aparición tardía, muy apropiado para el diagnóstico por inmunobloting.

### **RICKETSIAS. *Rochalimaea henselae***

Los gatos domésticos han sido identificados como el probable reservorio de un grupo de patógenos humanos recientemente descritos pertenecientes al género *Rochalimaea*, microorganismos de la familia *Rickettsiaceae*.

*Rochalimaea quintana* fué identificada durante la primera Guerra Mundial como la causa de la denominada fiebre quintana o fiebre de las trincheras.

Durante los últimos años se han reconocido dos nuevas especies: *Rochalimaea henselae* y *Rochalimaea elizabethae*, que fueron identificadas después de la investigación de varios síndromes clínicos diferentes, incluyendo la enfermedad por arañazos del gato, la angiomatosis bacilar y una bacteriemia recidivante y endocarditis. De estos problemas, la enfermedad por arañazos del gato es la más común y generalmente afecta a individuos sanos de diferente condición. La angiomatosis bacilar por el contrario, se detecta por lo general entre individuos infectados por el virus SIDA, aunque algunos no infectados también la presentan en ocasiones a partir de infecciones con *Rochalimaea henselae*.

*Rochalimaeae henseleae* ha sido aislada recientemente (Dolan *et al.*, 1993) a partir de los ganglios linfáticos de dos pacientes con enfermedad por arañazos del gato, detectándose ade-

más anticuerpos frente a esta rickettsia en el 84-88% de los pacientes con la enfermedad. Adicionalmente la secuencia del rRNA 18S de *Rochalimaea henselae* ha sido detectada en los antígenos de la prueba utilizada para el diagnóstico cutáneo de la enfermedad por arañazos del gato, que ha venido empleándose de modo relativamente empírico, durante muchos años.

El contacto con gatos, por ejemplo el lamido, los arañazos y las mordeduras, especialmente a partir de animales jóvenes, han sido implicados como procedimientos probables de transmisión. De igual modo, datos epidemiológicos parecen sugerir que *Rickettsia henselae* puede transmitirse por los mosquitos (Koehler *et al.*, 1994), quienes se infectarían a partir de los gatos y transmitirían por picadura la rickettsia al ser humano.

Anderson *et al.* (1994) han desarrollado un método PCR para la detección de este microorganismo a partir de muestras pacientes de la enfermedad por arañazos del gato.

A principios de 1994, en una reunión de investigadores que tuvo lugar en San Francisco (California, Estados Unidos) se señaló que los gatos asintomáticos eran los «principales reservorios persistentes» de esta rickettsia. La capacidad de *Rochalimaea henselae* para persistir y multiplicarse en la corriente sanguínea, por lo general estéril, resulta una característica única entre los patógenos que afectan a esta especie animal, siendo el gato doméstico aparentemente refractario o parcialmente resistente al desarrollo de manifestaciones clínicas apreciables. El tratamiento de los gatos afectados con antibióticos, así como los esfuerzos para el control de los mosquitos, colaborarían en el objetivo de reducir la incidencia de angiomatosis bacilar entre los humanos infectados por el virus del SIDA.

Los primeros estudios serológicos llevados a cabo con gatos han puesto de manifiesto que las infecciones por esta rickettsia son sucesos comunes y que los gatos pueden mantener la bacteriemia

durante al menos dos meses, incluso en presencia de anticuerpos séricos. Childs *et al.*, (1995) llevaron a cabo un estudio serológico a partir de muestras procedentes de 1370 gatos procedentes de distintos estados de los Estados Unidos (Texas, Maryland, Georgia, Maine y Kansas), conjuntamente con muestras procedentes de Egipto y Portugal. El 28'2% de los gatos americanos proporcionó títulos 64 frente a *Rickettsia henselae*, valores que descendían al 11'9 y 6'7% respectivamente en el caso de los gatos egipcios y portugueses. Los valores fueron mas altos cuando se investigaron anticuerpos frente a un antígeno de *Rickettsia quintana* (30'5; 19 y 14'3% respectivamente), datos que ponen de manifiesto que la infección por *Rickettsia henselae* está ampliamente difundida en todo el mundo (también se ha identificado en Suiza: Waldvogel *et al.*, 1994). Un hecho que puso de manifiesto el trabajo anterior, ya señalado previamente, es la existencia de reactividad cruzada entre ambas especies de rickettsias, lo que justifica los títulos positivos encontrados frente al segundo de los antígenos, pues de hecho, hasta la fecha nunca ha podido demostrarse la infección por *Rickettsia quintana*, incluyendo el uso de técnicas de PCR.

### **Micobacterias. Tuberculosis.**

En 1966, Bretenet ya predecía la importancia creciente de las tuberculosis animales y humana, así como el incremento de los casos en que un hospedador secundario, toma el lugar del principal en relación con muchas especies de micobacterias. En los últimos años, el género *Mycobacterium* vuelve a estar de actualidad como consecuencia del recrudecimiento de la tuberculosis humana. Según Hatfull (1994) *Mycobacterium tuberculosis* es responsable de más muertes en el mundo que cualquier otro patógeno considerado individualmente. La OMS estima que aproximadamente 1/3 de la población mundial está infectada con este microorganismo, aunque por fortuna la mayoría de las infecciones primarias no dan lugar a formas activas de la enfermedad; en

cualquier caso cada año se describen 10 millones de casos nuevos y se producen 3 millones de muertes por esta causa. En términos generales, la tuberculosis humana se responsabiliza del 6'7% de todas las muertes en los países en desarrollo, del 18'5% de todas las muertes en adultos de entre 15 y 59 años y del 26% de las muertes evitables (Murray *et al.*, 1992, cit por Bloom y Murray, 1992). A estos datos debe sumarse además la aparición e incremento de cepas resistentes a las drogas que amenazan nuestra capacidad para el control de la enfermedad; a título de ejemplo, una tercera parte de todos los casos investigados en la ciudad de Nueva York en 1991, fueron resistentes a una o más drogas, y la tasa de mortalidad por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a dos o más antibióticos principales (multiresistencia a las drogas) fué del 40 al 60% equivalente a tuberculosis sin tratar (Bloom y Murray, 1992). En nuestro país, las cifras de tuberculosis humana arrojan anualmente valores superiores a 50 nuevos casos por 100.000 habitantes.

Algunos autores han señalado como posibles causas del re-  
crudescimiento de la tuberculosis la epidemia actual de SIDA, el incremento de las poblaciones humanas sin hogar y de los adictos a las drogas, poblaciones que en muchos casos son coincidentes. No son ajenas otras posibles causas como la masiva utilización de terapias inmunosupresoras. Además, debe considerarse también la propia incapacidad de muchos gobiernos para mantener o mejorar sus programas de control de la tuberculosis, incluyendo en ello cuanto se refiere al mundo animal, en su condición de reservorios de algunas de las especies de micobacterias frente a las que el ser humano resulta receptible. En cualquier caso los investigadores parece que están de acuerdo en descartar como causa un incremento de la tasa de mutación de *Mycobacterium tuberculosis*, o un incremento de su virulencia (Weiss, 1992).

*Mycobacterium tuberculosis* constituye un complejo que incluye a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*,

*Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*. Estas especies son genéticamente muy semejantes, con un porcentaje de interrelación DNA-DNA del 85-100%, pero difieren epidemiológicamente. Para algunos autores, *Mycobacterium bovis* forma a su vez otro complejo que incluye *Mycobacterium bovis*, *BCG* y *Mycobacterium africanum*.

*Mycobacterium avium* incluye también a *Mycobacterium intracellulare*. Por otra parte, sobre la base de una creciente cantidad de información, cada vez se pone con más intensidad de manifiesto la proximidad entre *Mycobacterium avium* (complejo) y *Mycobacterium paratuberculosis*. Thoresen y Saxegaard (1991) han comunicado que una sonda genética para *Mycobacterium avium* (complejo) no diferenciaba esta especie de *Mycobacterium paratuberculosis*; el nivel de similaridad en el rRNA 16 S de ambas especies es del 99'9%.

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente de la tuberculosis humana, de la que continúa siendo la causa más frecuente; ha sido aislado también, de numerosas especies animales, tanto domésticas como silvestres. Ha sido recuperado de caballos, rinocerontes, elefantes, monos, cerdos, bovinos, perros, gatos y loros. También ha sido recuperado de las cabras.

*Mycobacterium bovis* es el agente de la tuberculosis bovina y produce también tuberculosis en otros rumiantes, tanto domésticos como silvestres; se ha aislado también de monos, perros, gatos, de un león, de un guepardo, de cerdos, y también de otros animales silvestres (rinoceronte), y posiblemente también de aves de presa. *Mycobacterium avium* es el agente habitual de la tuberculosis de las aves, aislándose también de pájaros y mamíferos (parece muy frecuente en el cerdo y también se aísla de los bovinos y el perro), y más raramente del medio ambiente.

El **ganado bovino** es sin duda alguna el centro de atención principal en materia de tuberculosis animal. En algunos países de

Europa, la tuberculosis bovina ha sido objeto a lo largo del presente siglo, de costosas campañas de saneamiento que han permitido conseguir en muchos de ellos su control hasta niveles mínimos, cuando no la completa erradicación de la enfermedad. En 1991, la situación de la tuberculosis bovina en nuestro país presentaba una incidencia del 3'5% sobre el total nacional, con una media por CC.AA. del 3'89%. En 1994, para el conjunto de Castilla y León, el porcentaje de positividad fué menor del 1'4%.

Entre los **pequeños rumiantes domésticos**, la cabra y en menor medida la oveja, sufren de la infección por micobacterias. En un estudio realizado en Murcia, por Bernabé *et al* (1990-91) se comunicó el aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de casos de tuberculosis caprina (lo que coincide con el absoluto predominio de esta especie sobre cualquiera otra de micobacterias, siempre superior al 90%, señalado por numerosos autores) y en un solo caso se aisló *Mycobacterium tuberculosis*, en lo que se fundamenta el alto interés de este animal como fuente de contagio para el hombre; la presencia de *Mycobacterium avium* ha sido identificada por algunos autores en un porcentaje inferior al 3%. En la cabra, las lesiones de tuberculosis son semejantes a las que se observan en el bovino. Otros autores señalan la presencia de mamitis. En el caso de las ovejas, la tuberculosis es mucho menos frecuente, aunque se consideran altamente susceptibles a *Mycobacterium bovis*, mucho menos sensibles a *Mycobacterium avium* y prácticamente resistentes a *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis en la cabra ha sido repetidamente descrita a lo largo de los últimos años. Ha sido comunicada en Francia, en Alemania, en Estados Unidos, en Inglaterra, Irlanda, en Bulgaria, en Italia, etc., En España, Bernabé *et al*, 1990-91 han confirmado que esta enfermedad en la región de Murcia es uno de los procesos del ganado caprino más importantes.

Además de estos rumiantes, otros animales pueden albergar también *Mycobacterium bovis*, constituyendo posibles reservorios, tanto para los hospedadores tradicionales (el ganado bovino) como para el propio ser humano, constituyendo así un problema de salud pública. En España recientemente (Novoa *et al.*, 1995) se ha reflejado la importancia de los gatos, como posible reservorio adicional de este tipo de microorganismos; en un estudio que incluyó 18 animales diagnosticados tuberculosis, en 11 de ellos (el 61'2%) se aislaron *Mycobacterium bovis*. *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis* fueron aislados también, aunque en porcentajes menores. En estos últimos tiempos, en el Reino Unido se ha descrito la importancia de los tejones como reservorios de la infección para el ganado bovino de modo particular, siendo la causa de un recrudecimiento importante de la tuberculosis bovina en regiones del suroeste de Inglaterra, que representó incrementos de casi el 100% entre 1992 y 1993 en núcleos concretos del Valle de Exe en Somerset, una zona donde la tuberculosis no se había confirmado desde hacía más de 20 años. Datos recientes han descrito hasta un 22% de algunas poblaciones de tejones infectadas por *Mycobacterium bovis*. Entre los animales silvestres africanos, la tuberculosis por *Mycobacterium bovis* se ha reconocido también como un grave problema de las especies del género *Oryx*, que se agrava cuando estos artiodáctilos se mantienen en cautividad; el *Oryx leucoryx*, el oryx arábigo resulta a este respecto particularmente sensible.

Desde un punto de vista zoonótico todavía permanecen sin responder muchas preguntas en la epidemiología de la tuberculosis humana debida a *Mycobacterium bovis*. La enfermedad se transmite principalmente desde el ganado bovino al hombre mediante la vía aerógena e indirectamente a través del consumo de leche. La enfermedad primaria humana debida a *Mycobacterium bovis* es muy rara en los países desarrollados, pero la forma post-primaria (reactivación) transmisible, todavía se describe ocasio-

nalmente. Casi todos los casos de enfermedad primaria debida a *Mycobacterium bovis* no son pulmonares pero aproximadamente la mitad de los de reactivación que se describen implican los pulmones. Estos hechos aumentan las posibilidades de que la transmisión hombre-hombre de tuberculosis por *Mycobacterium bovis* pueda tener lugar todavía.

Casos de SIDA asociados a tuberculosis humana debida a *Mycobacterium bovis* han sido señalados en varios lugares del mundo, como Inglaterra, Francia y el Sur de California. La posibilidad de que la infección por el virus pueda conducir a una perpetuación del ciclo de transmisión animal-hombre, hombre-hombre y hombre-animal requiere ser considerada muy cuidadosamente pues por ej., recientemente se ha confirmado la transmisión de la enfermedad hombre-hombre, debida a *Mycobacterium bovis* en individuos con SIDA en un hospital de Paris, en el que un caso-fuente infectó 5 pacientes con una cepa de *Mycobacterium bovis* resistente a numerosas drogas antituberculosas.

En el presente, *Mycobacterium bovis* puede ser identificado mediante cultivos y pruebas bioquímicas. «Primers» específicos para PCR y sondas de DNA comienzan ya a estar disponibles, lo que permitirá resolver el actual problema de desconocimiento de la incidencia de la enfermedad humana debida a *Mycobacterium bovis*, así como conocer la dinámica de su transmisión entre o dentro de humanos y poblaciones animales.

En su «*Tratado sobre Zoonosis*», Acha (1977) define como rara y ocasional la infección humana por *Mycobacterium avium*, con la particularidad de señalar que en su mayoría se trata de casos de linfadenitis o tuberculosis pulmonar, de presentación especial en América Latina. En los últimos años, *Mycobacterium avium* y en general todo el complejo del que forma parte, ha adquirido una importancia muy particular al asociarse con frecuencia a individuos inmunodeprimidos, constituyéndose así en

patógenos oportunistas de gran interés. Hawkins *et al.* en 1986 señalaron que en pacientes de SIDA, la presencia de infección diseminada por esta causa alcanzaba hasta el 53% de los pacientes. En 1992 Nightingale *et al.*, señalaron que las infecciones por el complejo de *Mycobacterium avium* se presentaban de modo casi invariable en hasta el 40% de los pacientes con una infección avanzada por el virus HIV, y entre estos, más del 95% de los aislamientos resultaban ser cepas de *Mycobacterium avium* (Yakrus y Good, 1990). En la actualidad, muchos autores son ya de la opinión de que el complejo *Mycobacterium avium* representa la infección bacteriana más común en los pacientes de SIDA.

Alimentos y bebidas contaminados pueden constituirse en fuentes principales de infección dado que estos microorganismos se asocian a menudo con la mucosa intestinal y por eso pueden aislarse de muestras fecales, constituyendo así el ambiente un punto de infección común a través del suelo, agua o polvo; sin embargo la infección como bien se sabe, puede adquirirse también mediante el contacto con aves o animales domésticos o silvestres.

Por lo general, la historia individual de un caso de tuberculosis comienza con la inhalación de bacilos en suspensión en el aire o la ingestión de un alimento contaminado. En el primer supuesto, la mayoría de los microorganismos se detienen en los bronquios y bronquiolos, siendo arrastrados por el mucus hacia la faringe y posteriormente deglutidos. El pH del estómago y las enzimas del jugo gástrico se bastan por lo general para promover su destrucción completa. Unos pocos microorganismos sin embargo, son capaces de acceder a los alveolos pulmonares, donde los macrófagos alveolares dan cuenta de ellos sin problemas; sin embargo, los microorganismos virulentos sobreviven y son capaces de multiplicarse en su interior, estableciendo un foco que puede contener en sus comienzos entre  $10^3$  y  $10^6$  bacterias. Algunos microorganismos atraviesan el alveolo y llegan hasta los ganglios

regionales próximos, estableciendo así nuevos focos de infección (focos ganglionares), que conjuntamente con los primeros atraen oleadas de macrófagos y linfocitos, particularmente poblaciones de T<sub>4</sub> y T<sub>8</sub>. Se reclutan también monocitos y son evidentes la liberación de citoquinas, sobre todo interferón y factor de la necrosis tumoral. Los linfocitos T<sub>4</sub> reconocen diferentes antígenos con seguridad implicados en el control de las micobacterias. Los linfocitos T<sub>8</sub> poseen *in vitro* actividad citotóxica específica frente a los macrófagos infectados.

En la mayoría de los casos el foco permanece limitado por una cápsula fibrosa originada por la reacción inflamatoria, produciéndose así un tubérculo cuyo fin será probablemente la calcificación y consiguiente degeneración, aunque durante mucho tiempo persisten en él micobacterias en estado latente, por lo que cabe suponer que desde el foco ganglionar o pulmonar pueden pasar microorganismos a la circulación general, originando a la postre múltiples focos infecciosos. El otro camino de la patogenia del tuberculo se dirige hacia el reblandecimiento, licuación y evacuación del material del mismo a través de un bronquiolo o bronquio, originando una caverna desde la cual se eliminan al medio a través de la tos o secreciones, cantidades importantes de microorganismos.

El curso de la tuberculosis en individuos infectados con el virus HIV de la inmunodeficiencia humana, resulta dramáticamente distinto. La tuberculosis es una enfermedad centinela del SIDA a consecuencia de que al contrario que sucede con la mayoría de los microorganismos oportunistas, la tuberculosis es el primer indicador de la infección por este virus.

En pocas infecciones resulta tan esencial el conocimiento tanto del microorganismo como de la respuesta del hospedador para poder comprender la patogénesis. Las micobacterias son

microorganismos difíciles de estudiar, pues además de su lento crecimiento disponen de una pared celular única que incluye múltiples lípidos complejos y carbohidratos que la hacen impermeable a la mayoría de las drogas antimicrobianas que resultan eficaces con otros microorganismos. Hasta hace menos de una década prácticamente no conocíamos nada o muy poco de las características genéticas de este microorganismo, pero en corto tiempo se han adaptado métodos que permiten la transferencia genética en micobacterias y la selección de recombinantes que contienen los genes introducidos y que permiten la expresión de genes extraños. La epidemiología molecular puede ser utilizada para averiguar las fuentes de infección y la transmisión de las cepas individualmente consideradas, incluyendo las bacterias resistentes a las drogas. En cualquier caso, todavía nuestro conocimiento de la base molecular de la virulencia y patogénesis de estos microorganismos es muy reducido. Aunque existen cepas avirulentas de *Mycobacterium bovis* y de *Mycobacterium tuberculosis*, la naturaleza de las mutaciones que las originaron se desconoce y todavía no se ha podido definir ningún gen implicado en la patogénesis de la tuberculosis. Igualmente se desconoce la base molecular de la invasión de las células hospedadoras, de la supervivencia intracelular, del crecimiento, de la difusión o del tropismo tisular. Hasta la fecha tampoco ha sido posible caracterizar a nivel molecular prácticamente ningún receptor de las drogas antituberculosas disponibles (sólamente se han realizado las primeras observaciones con éxito en el caso de la isoniazida; Zhang *et al.*, 1992), ni se ha definido tampoco el mecanismo de la resistencia.

## II. VIRUS

### *Morbillivirus equino*

En el presente año (Murray *et al.*, 1995) se ha descrito la aparición de un tipo de virus más tarde identificado como *Morbillivirus*, próximo al virus de la peste bovina, sarampión y moquillo canino, que fué la causa de la muerte de 14 caballos y un ser humano.

El proceso tuvo lugar en Brisbane (Australia) en setiembre de 1994 y cursó con enfermedad respiratoria grave con fiebre alta y dificultad respiratoria muy acusada, que produjo la muerte de 14 de un total de 21 animales afectados. Del mismo modo resultaron afectados con un cuadro clínico de tipo gripal, un empleado de los establos y un entrenador, falleciendo este último, en el que pudo observarse postmortem una neumonía intersticial.

Homogeinizados de baño y pulmón procedente de los animales muertos, fué inoculado intravenosa e intranasalmente en dos caballos sanos, así como en varios tipos de cultivos celulares, entre los que se incluían células Vero, en las que al cabo de 3 días pudo observarse la formación de sincitios focales, que posteriormente difundían al total de la monocapa. De igual modo, material de origen humano (pulmón, hígado, riñón y bazo) fue también inoculado en cultivos celulares y al cabo de 12 días pudo observarse la presencia de sincitios muy evidentes en LLC-MK2 y en MRC5 inoculados con material de origen renal. Los caballos inoculados experimentalmente desarrollaron la enfermedad al cabo de 6 y 10 días respectivamente, siendo sacrificados al cabo de 48 horas, observando repetido el cuadro histológico, que incluía neumonía intersticial con edema alveolar proteináceo asociado con hemorragia, infarto ganglionar, trombosis alveolar y necrosis entre otros de las paredes de los pequeños vasos.

En el interior de las células gigantes, podían observarse cuerpos de inclusión citoplasmáticos que incluían nucleocápsidas de estructura semejante a la que se observa en la familia *Paramyxoviridae*. El virus descrito aparecía pleomórfico, con envoltura, con rango de tamaño de entre 38 y mas de 600 nm. Se podían apreciar proyecciones de superficie de 10-18 nm de longitud, que le daban a la partícula una apariencia de «doble borde», característica específica de este tipo de virus. Mediante inmunofluorescencia e inmunoblot frente a antisueros de *Paramyxovirus*, *Morbillivirus* y *Pneumovirus*, pudo comprobarse su pertenencia a los segundos.

Análisis filogenéticos llevados a cabo sobre las secuencias de la matriz proteica pusieron de manifiesto que este *Morbillivirus* se relacionaba a distancia con otros miembros conocidos del grupo.

Después del brote referido, no se observó ningún caso mas ni en caballos ni en seres humanos. La vigilancia serológica de mas de 1600 caballos y alrededor de 90 humanos mediante suero neutralización, puso de manifiesto que el virus no se difundió, lo que sugiere que esta nueva especie hospedadora no había sido previamente expuesta a este virus. Antes del aislamiento de este virus, el rango de hospedadores de cada tipo de Morbillivirus se restringía únicamente al orden *Mammalia*. Los análisis filogenéticos sugieren que este virus no fué el resultado de una mutación única, o de unas pocas mutaciones puntuales clave, sino mas probablemente que se trata de un virus que apareció a partir de un cambio de hospedador natural. En la actualidad se desarrollan investigaciones para identificar la especie hospedadora original y las circunstancias en las que se produjo tal cambio de hospedador.

## Virus rábico

El virus rábico es un *Rhabdovirus* típico, perteneciente al grupo *Lyssavirus*, con forma de bala, una hélice de ARN mc recubierto por una cubierta proteica, y una envoltura, en la que emergen una serie de espículas o proyecciones terminadas en una protuberancia final. Su composición incluye proteínas (67%), lípidos (26%), ARN (4%) y carbohidratos (3%). El componente más abundante son las proteínas, de las que se incluyen los tipos **G y M (en la envoltura) y N, NS y L (en la nucleocápsida)**. La **proteína G** tiene carácter de glicoproteína, fuertemente antigénica, estimulando la formación de anticuerpos neutralizantes y fijadores del complemento. Esta relacionada con la virulencia del virus además de que estimula la formación de linfocitos Tc. Su inoculación, protege además frente al virus entero. La **proteína N** constituye el antígeno de grupo. La diferenciación en tipos, se basa en la puesta de manifiesto de los antígenos de superficie mediante el uso de anticuerpos monoclonales por fijación del complemento, fluorescencia o neutralización. Se describen cuatro serotipos, aunque solo el primero se considera en rigor virus rábico, refiriéndose el resto como «virus semejantes al de la rabia». Al **serotipo 1** o **virus clásico** pertenecen la mayoría de las cepas, virus de la calle, de laboratorio y vacunales; El **serotipo 2** está representado por la cepa «**Lagos bat**» aislada en Nigeria a partir de una mezcla de encéfalos de murciélagos (*Eidolon helvum*) (se han descrito 3 subtipos); el **serotipo 3**, aislado también en Nigeria del hombre y de una musaraña, que tiene como prototipo la cepa «**mokola**» (se han descrito 5 subtipos), y finalmente, el **serotipo 4**, cuyo prototipo es la cepa «**duvenhage**» aislada de un hombre mordido por un murciélago en Africa del Sur (se han descrito 3 subtipos). Permanecen sin clasificar aún, otras cepas como las **EBL** (European Bat Lyssavirus) que se han subdividido en dos biotipos (**EBL-1 y EBL-2**) con genotipos distintos, que en conjunto se han propuesto para constituir el **serotipo 5**, así como

otros aislamientos procedentes de seres humanos infectados por murciélagos en Finlandia y Ucrania. Las EBL fueron inicialmente clasificadas como serotipo 4 sobre la base de sus interrelaciones antigénicas y aunque EBL-1 se sitúa antigénica y genéticamente más próxima al virus Duvenhague, más tarde fueron reconocidas como aislamientos independientes.

Desde el punto de vista genético, en cuanto se refiere a posibles fundamentos de su variabilidad en el espacio y en el tiempo, el virus rábico no presenta ni complementación, ni recombinación. En cuanto se refiere a la complementación, el virus rábico en una supuesta coinfección es incapaz de aprovechar material de otra partícula para reemplazar posibles proteínas propias deficientes.

El virus rábico, como el resto de los virus ARN no segmentados de polaridad negativa, no produce fenómenos de recombinación genética. Si en la práctica se infecta por ej., una célula con dos mutantes, no se obtienen virus recombinantes que porten características de ambos mutantes. La progenie obtenida es idéntica a ambas partículas coinfectantes.

El estudio genético del virus rábico puede abordarse mediante la selección de mutantes de diferentes proteínas. En la práctica pueden aislarse mutantes termosensibles o mutantes antigénicos, resistentes a la neutralización por un anticuerpo monoclonal, categoría en la que se han obtenido mutantes de patogenicidad. Los mutantes termosensibles se originan por la sustitución de un aminoácido en una de las cinco proteínas víricas. Los antigénicos resultan de la sustitución de un aminoácido en la proteína G.

Es relativamente fácil aislar mutantes termosensibles, que se caracterizan por inhibir su replicación en cultivo por encima de 38'5°C, aunque se multiplican sin problemas a 33°C. La tasa de mutación espontánea se sitúa en el 0'3%, multiplicándose por 10

si se introduce un agente mutágeno. Ciertos mutantes termosensibles son virus muy atenuados, aunque no protegen al animal contra una sobreinfección por una cepa virulenta.

Los mutantes antigénicos se aislan entre los virus resistentes a la neutralización por un anticuerpo monoclonal. Se ha trabajado intensamente con las cepas ERA<sup>5</sup> y CVS<sup>6</sup>, utilizando una quince-  
na de monoclonales neutralizantes de una u otra de estas cepas. La frecuencia de aislamiento varía entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$ , según el tipo de anticuerpo utilizado, multiplicándose por 10 con ayuda de un mutágeno como el 5FU a dosis de 50 g por ml. Todos estos mutantes resistentes a la neutralización pierden la virulencia para el ratón adulto en condiciones experimentales, y aunque los animales recién nacidos son sensibles, rápidamente (en 5-6 semanas) se vuelven resistentes. A nivel molecular, la mutación supone la sustitución del aminoácido arginina en posición 333 del sitio antigénico III de la proteína G, por glutamina, glicina o isoleucina. La consecuencia de la mutación supone que las cepas víricas son incapaces de invadir la misma categoría de neuronas que la cepa parental. La tasa de anticuerpos circulantes, linfocitos Tc y de interferón es elevada como consecuencia de la inmunización con estos mutantes, todo lo cual supone una buena protección frente a la sobreinfección por un virus de prueba.

Desde el punto de vista de la variabilidad genética de las cepas de campo del virus rábico, se ha podido observar en el laboratorio que: 1) La tasa de mutación espontánea es variable, aunque por lo general relativamente elevada, mas en el caso de los termosensibles que de los antigénicos; 2) En cualquier caso y pese a esta tasa de mutación, el virus permanece relativamente estable. Las observaciones realizadas por ej., sobre las cepas ERA y CVS ponen de manifiesto que sus nucleocápsidas no muestran prácticamente ninguna diferencia destacable desde su aislamiento (1882 en el caso de la cepa CVS y 1953 en el caso de la cepa ERA) y ambas han sufrido hasta ahora miles de pases en conejo y

ratón (CVS) o en ratón (ERA). El análisis de los aminoácidos de la proteína G de ambas cepas muestra un 89% de analogía, aunque si se utilizan anticuerpos monoclonales apropiados las diferencias antigénicas son descartables. La proteína G parece tener mayor variabilidad que la nucleocápsida. 3) Todas las cepas del virus rábico no están tan relacionadas entre sí como las anteriores; es el caso de los virus «semejantes al de la rabia» como el Mokola o el lagos Bat. A menudo se ha planteado la pregunta de si todos estos virus proceden o no de un ancestro común, cuestión que por el momento permanece sin respuesta.

La rabia constituye probablemente la zoonosis vírica mejor conocida, más vinculada a la historia de la humanidad, y por su propio carácter, modelo de estudio y campo de pruebas en materia de biología vírica, prevención y control a lo largo de los años.

Es bien sabido que con pocas excepciones, de uno u otro modo, con uno u otro hospedador protagonista, la mayor parte del planeta sufre de esta temida enfermedad, que aún cuenta en su haber anual, con miles de víctimas humanas (más de 25.000 muertes anuales), afectando particularmente a muchos países en vías de desarrollo o del denominado tercer mundo, sin contar otras repercusiones económicas, sanitarias o sociales.

El carácter emergente del virus rábico hay que buscarlo en relación con su presencia en hospedadores no domésticos. La rabia del perro o del gato, problema principal del pasado y restringido ahora a determinadas áreas geográficas de la región mediterránea, sudamérica y oriente, ha dejado paso desde hace años al protagonismo de algunos hospedadores silvestres que han centrado por completo la atención, sobre todo en Europa y ahora también en América del Norte. Desde el siglo XIX se vienen describiendo casos de rabia en el zorro y en 1900 se describieron por primera vez casos de rabia bovina producida por mordedura de murciélagos vampiros.

La rabia vulpina ha centrado desde hace años la atención en Europa. Según todos los indicios, el actual foco tuvo su origen remoto en un foco localizado en Groenlandia, Rusia y norte de Canadá. Entre 1930 y 1935 se detectó un foco en Polonia que durante muchos años permaneció localizado, pero que como consecuencia de la IIª Guerra Mundial, con la rotura del equilibrio ecológico se produjeron condiciones favorecedoras para su difusión tanto en dirección este como oeste. El pico se produjo en 1989, año en que de los más de 24.000 casos de rabia en Europa, mas del 77% correspondieron a rabia del zorro. Afortunadamente, en los últimos años se han conseguido éxitos importantes merced a la actuación con vacunas orales, que han hecho descender espectacularmente las cifras anteriores pasando en 1993 a 9.383 casos, representando aún el zorro por si solo mas del 66%.

A estos hechos es preciso sumar también algunos otros aspectos que al menos en Europa constituyen cierta novedad en los últimos años; por un lado, la presencia de un número creciente de casos de rabia en quirópteros, que ha pasado de representar casi una anédocta, o en todo caso un número pequeño de casos (entre 1954 y 1984 solamente se habían registrado en Europa 14 casos de rabia en murciélagos) asociados con unos pocos países (Alemania, Yugoslavia, Turquía, Polonia y la Unión Soviética) y a prácticamente 3 especies de murciélagos, *Eptesicus serotinus*, *Pipistrellus pipistrellus* y *Myotis daubentoni*, a constituir un número discreto pero estable de casos en muchos mas países (a partir de 1985 el número de casos ha llegado a alcanzar la cifra anual de 140 en 1989, estabilizándose en torno a 40 casos por año a partir de esa fecha). Se han diagnosticado casos en Dinamarca, Alemania, Holanda, España, Italia, Francia, Checoslovaquia y Finlandia, en los que además cada vez mayor número de especies se ven implicadas, aunque si bien muy afines a las anteriores, permaneciendo fieles al serotipo 4 (Duvnhague) del virus rábico, según se afirma importado a Europa a partir de un murciélago infectado escondido en un barco.

En el continente americano, particularmente en América del Norte, se observa en estos años un recrudecimiento de la rabia silvestre que tiene al mapache como centro principal de atención, representando alrededor del 37% del total de casos descritos en 1992 (aproximadamente 8.000 casos en total), mientras que la rabia en animales domésticos permanece en un nivel relativamente bajo. Según se ha señalado, tuvo su origen en la introducción en los años 70 de mapaches traídos desde regiones endémicas del sudeste a la costa atlántica, con propósitos de repoblación. En la actualidad se describen casos desde Florida a New Jersey, y aunque hasta la fecha no se han descrito casos humanos de esta responsabilidad, existe la posibilidad de transmisión, sobre todo como consecuencia de la coincidencia de grandes poblaciones de mapaches en áreas humanas muy pobladas.

En resumen pues, el interés mundial por la rabia sigue plenamente vigente en 1995 y muchos de los éxitos conseguidos en la lucha contra la rabia vulpina en Europa, es deseable se amplíen a otras especies silvestres y aún domésticas, en otras regiones geográficas del mundo.

El control de la rabia en animales silvestres ha sido practicado a lo largo de los últimos años mediante multitud de procedimientos. Desde el principio se han aplicado básicamente sistemas de reducción de las poblaciones de hospedadores diana, incluyendo el uso de batidas de caza, trampas, etc.; por procedimientos químicos como el gaseado de madrigueras, o por procedimientos biológicos, a través de métodos esterilizantes; no obstante, el control por vacunación, constituye en estos momentos un punto de especial atención por parte de las autoridades sanitarias.

Las primeras experiencias de vacunación en el zorro se remontan al comienzo de los años setenta, cuando Baer demostró en los Estados Unidos que esta especie podía vacunarse mediante la simple distribución de cebos conteniendo virus vacunal. El uso de la vía oral como procedimiento de vacunación, ha sido

objeto de numerosos estudios, habiéndose incluido en las vacunas tanto virus inactivados como virus vivos; a este respecto, las cepas más utilizadas han sido la cepa SAD<sup>7</sup> y su derivada la cepa ERA.

En la práctica, se utilizan dos posibles entradas para el virus; por un lado la vía orofaríngea, que exige un contacto estrecho entre las mucosas y la vacuna, y por otro la vía intestinal, que supone que las vías digestivas sean atravesadas rápidamente para que no exista deterioro en el producto vacunal. Los mejores resultados se han obtenido incluyendo el virus en pequeñas cápsulas de diámetro inferior a 1'5 mm, vehiculadas en carne picada, salchichas, galletas, huevos, ratoncillos y sobre todo cabezas de pollo. La distribución de estos cebos debe alcanzar por término medio 20 por km<sup>2</sup> (para otros autores entre 5 y 15, según el tipo de terreno), con lo que se estima que se puede inmunizar el 80% (para otros autores entre el 60-70%) de los zorros de una región y detener el avance de la epizootia, a condición de que la densidad sea inferior a 3 animales por km<sup>2</sup>.

Debe hacerse notar en cualquier caso, que los carnívoros silvestres poseen diferentes modelos de comportamiento, ecología y dinámica de poblaciones y que por ello, los cebos que son convenientes para una especie raramente son eficaces para otras. Cada especie, por tanto, requiere sistemas de cebo muy específicos para maximizar la aceptación por ella y minimizar los disturbios que el cebo puede originar para especies diferentes. En los últimos años se ha llevado a cabo mucha investigación sobre técnicas de cebos para el zorro rojo, pero existe muy poca información en relación con chacales, mangostas, mofetas y otras especies, por lo que es recomendable incidir y ampliar estos conocimientos. En relación con el problema comentado atrás de la epizootia de rabia de mapaches en Estados Unidos, en una nota editorial se reclamaba no hace mucho tiempo la necesidad de ensayos de campo para establecer el método apropiado de distribución de los cebos, la

mínima dosis efectiva por área geográfica, la densidad de cebos por unidad de superficie, la frecuencia y la mejor época del año para la vacunación según el tipo de habitat, cuestiones todas ellas que pueden hacer variar la estrategia a aplicar en un momento y lugar determinados. La mangosta es también un hospedador importante en la transmisión del virus de la rabia y considerando que en algunos lugares sus poblaciones pueden llegar a alcanzar número importante, cuantas consideraciones se han hecho antes, son aquí igualmente válidas.

En relación con el zorro y la epizootia europea, ya desde 1978 varios países iniciaron ensayos de vacunación a gran escala utilizando la cepa SAD standard o el clon B19 de esta cepa (SAD B19), cepa atenuada adaptada a crecer en en BHK<sup>8</sup> y producida en Tübingen (una dosis incluía 1'8 ml de una suspensión virica contenida en una cápsula hermética) utilizando cebos a base de grasa, harina de huesos y pescado con tetraciclina como marcador, que se distribuían a razón de 11 por km<sup>2</sup>. Los resultados obtenidos con las primeras campañas de vacunación probaron la eficacia, inocuidad y estabilidad de los productos vacunales utilizados.

En un área suiza de casi 14.000 km<sup>2</sup> se distribuyeron entre la primavera de 1983 y 1984, más de 400.000 dosis de vacuna con una eficacia de inmunización efectiva del 50-75%. Desde esta fecha, muchos países europeos bajo los auspicios de la OMS, iniciaron un plan de ensayos de vacunación, en base al menos a dos campañas anuales (primavera y otoño); en este sentido por ejemplo, comenzaron los trabajos de este tipo de inmunización en Alemania en 1983, vacunándose un total de 3.000 km<sup>2</sup>, que pasaron a ser 80.000 en 1987. A partir de 1985 se incorporaron a esta iniciativa de vacunación Italia, Austria, Luxemburgo, Bélgica y Francia, recibándose asistencia de la UE a partir de 1989. En 1986 se inició un proyecto internacional en el que se implicaron cuatro países europeos (Luxemburgo, Alemania Oeste, Francia y Bélgica),

con protocolos experimentales y estrategias de acuerdo con la OMS, y autoridades políticas y científicas de los cuatro países. El propósito fué crear un anillo inmune alrededor de la frontera este de Luxemburgo, cuyos territorios habían sido cubiertos completamente por vacunación. En la actualidad, el programa se ha extendido a muchos países, incluyendo Checoslovaquia (en la actualidad mantienen las campañas tanto la República Checa como Eslovaquia) en la primavera de 1989, en la RDA en octubre de 1989, en la FDA en 1988, en Finlandia en 1988, año en que también se incorporó Holanda, y en Italia se llevaron a cabo ensayos en diversas provincias en 1989. En el caso de Francia, en la primavera de 1990 se había cubierto ya una superficie de casi 43.000 km<sup>2</sup>. Buena prueba de la eficacia de la vacunación oral se desprende de los resultados obtenidos en Finlandia e Italia, que después de la reinfección en 1988, iniciaron un programa de vacunación oral que en 1990 había rendido ya excelentes frutos, al no haber señalado en este periodo caso alguno. Posteriormente se ha incorporado Hungría, y en 1992 todos estos países habían repetido sus campañas al menos una vez. Los resultados obtenidos han permitido un descenso espectacular en el número de casos, que ya fue referido al principio de este estudio.

Al lado de estas experiencias, la ingeniería genética permitió poner a punto una vacuna recombinante. A partir de 1981, varios investigadores del Instituto Wistar, identificaron y clonaron un fragmento de ADN de la cepa ERA que codificaba para la proteína G. Posteriormente, varios grupos de trabajo consiguieron la expresión de la glicoproteína en *Escherichia coli* como una proteína más de las sintetizadas por la bacteria. Se ha sustituido alternativamente *Escherichia coli* por *Saccharomyces cerevisiae*, con la particularidad de que el antígeno de superficie sintetizado en la levadura, es glicosilado. También se han ensayado células animales en las que pueden utilizarse diferentes sistemas vectores de expresión, por ej., la integración del ADN en un cromosoma

celular, o la transformación de las células por un virus recombinante del papiloma bovino o como alternativa a este procedimiento, el uso del virus vacuna como vector. La experiencia europea se centra en el uso de la vacuna de virus «vaccinia» recombinante (virus vaccinia vivo, cepa Copenhague) modificado, recombinante con ADN del virus rábico (cepa ERA: VVTGgRAB-26D3), crecida en células Vero hasta un título de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. La vacuna fué desarrollada por investigadores de la Facultad de Veterinaria de Bruselas, Instituto Pasteur, Rhone-Merieux y la sociedad Transgene. La vacuna se dispone en cápsulas que se introducen en la región del cuello de una cabeza de pollo. Cada cápsula contiene 1'5 ml de una suspensión de  $10^8$  TCID<sub>50</sub> del virus recombinante. Cada cabeza de pollo contiene además 150 mg de tetraciclina como marcador.

Estos productos de recombinación han sido y son en la actualidad objeto de ensayos en el campo, conjuntamente con los sistemas tradicionales de la cepa SAD B19. Uno de los aspectos que permanecen sin conocerse en la actualidad se refiere a si la introducción de genes adicionales (proteína G, proteína N, inmunomoduladores, linfoquinas, etc.) incrementa o no la eficacia de las vacunas. En los Estados Unidos está siendo probada una vacuna recombinante para la vacunación oral del mapache.

La OMS ha anunciado para 1996 los primeros ensayos de campo controlados de vacunación oral en el perro, que serán llevados a cabo en Tunez, Turquía y diversas áreas de Sudamérica

La vacunación oral es un poderoso instrumento que por primera vez ha permitido que la rabia se haya erradicado de grandes áreas en Europa. Como se ha dicho, varios países han experimentado reinvasiones, incluso mas de una vez. Ultimamente se ha observado que cuando las áreas que se infectaron mantenian altas poblaciones de zorros sin protección, los brotes de la enfermedad fueron explosivos.

Uno de los objetivos de investigación futura sobre vacunas en el caso de la rabia, incluye no solamente las direcciones marcadas hasta ahora en relación con las vacunas genéticas orales para la rabia del zorro, sino también la extrapolación de estas aplicaciones a otros carnívoros y quirópteros, (en la actualidad se investiga en el desarrollo de cebos para mapaches) así como la búsqueda de nuevos sistemas de aplicación de las mismas. Las vacunas atenuadas actualmente utilizadas para la vacunación oral de los animales silvestres exhiben patogenicidad residual, al menos para especies diferentes de las diana, debiendo investigar para la eliminación de este riesgo mediante mutaciones específicas obtenidas a través de la selección de mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales específicos. A este respecto, se ha seleccionado un mutante sencillo del virus SAD, que no es más patogénico ni para perros, ni para roedores, ni tampoco incluso para zorros adultos, recomendándose la realización de pruebas de campo acerca del poder protector para zorros y perros. Con carácter general, habida cuenta de la alta tasa de reversión que poseen todos los virus RNA, se recomienda la selección de mutantes avirulentos dobles.

Otra de las recomendaciones que se hacen desde la voz de los expertos internacionales en materia de rabia incluye la investigación en el mecanismo de la respuesta inmune después de la vacunación oral, y ello considerando la mayoría de los hospedadores importantes del virus rábico, que por el momento son en buena medida desconocidos a este respecto.

En relación con los requisitos para la seguridad y potencia de las vacunas utilizadas para la aplicación oral, necesitan investigarse varios aspectos, como los requerimientos mínimos de uso en especies diferentes de los zorros, los criterios acerca de qué tipo de especies deben de ser investigadas como «especies no diana», en relación con su atracción por los cebos comúnmente utilizados, el uso de las modernas técnicas inmunohistoquímicas

y PCR para el estudio de la patogenicidad del virus vaccinia en las especies animales seleccionadas, el desarrollo de modelos de laboratorio para el estudio de la seguridad en hospedadores inmunocomprometidos o la investigación acerca de la actividad protectora de las vacunas inactivadas presentes o de la potencia de las inmunoglobulinas antirrábicas frente al virus Duvenhague de los murciélagos europeos.

### **Virus de Marburgo y Ebola**

En 1967 y de modo simultáneo en la ciudad alemana de Marburgo (en los laboratorios Behring Works), en Frankfurt y en Belgrado (antigua Yugoslavia), se produjo un brote de fiebre hemorrágica entre los empleados encargados de procesar riñones de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) para la obtención de cultivos celulares con destino a la obtención de antígenos víricos para la producción de vacunas contra poliovirus (Fenner, 1992). En total enfermaron 31 personas entre empleados y el personal médico que se ocupó de la atención de los enfermos, con un total de 7 fallecimientos que mostraban hemorragias múltiples y efectos en el cerebro comparables a los que produce el virus rábico. De la sangre y tejidos de los pacientes mediante inoculación en cobaya y cultivos celulares, se aisló un virus hasta entonces desconocido, no relacionado ni morfológica ni antigénicamente con ningún otro virus (Smith *et al.*, 1967). Muchos de los monos de un envío procedente de Uganda murieron de una enfermedad hemorrágica semejante a la observada en los enfermos humanos.

Después de este episodio el virus desapareció por un tiempo, hasta 1975, año en que se describieron 3 casos nuevos en Johannesburgo (Sudáfrica), parece que contagiados a partir de uno de ellos que había visitado Zimbawe poco tiempo antes de sentirse enfermo, falleciendo al cabo de 12 días después de la aparición de los primeros síntomas; los otros dos enfermos sobre-

vivieron. En julio de 1976, en la región meridional del Sudán, un empleado de un almacén de algodón murió con hemorragias múltiples, difundiéndose la enfermedad en las ciudades de Nzara y Maridi, con decenas de casos, incluyendo personal médico y auxiliares. Dos meses después se describieron los primeros casos en el Zaire, en la región de Bumba, típicamente una zona de bosque húmedo tropical. El virus, desde la misión de Yambuku, se extendió a 55 aldeas cercanas matando a decenas de personas. Una monja enferma fué trasladada al hospital de la capital, Kinshasa, donde también se describieron algunos casos. Las graves epidemias del Sudán y Zaire, se saldaron con más de 550 casos y más de 430 fallecimientos.

El 1 de enero de 1980 un ciudadano francés residente en Kenya, empleado de una compañía azucarera, después de visitar una cueva (cueva Kitum) en el monte Elgón, contrajo la enfermedad y murió en Nairobi. La presumible zona de contagio estaba relativamente próxima a la de Uganda, lugar de donde procedían los monos que fueron causa del primer brote, pero los estudios serológicos en este área no permitieron descubrir la fuente del virus. En 1987, el virus volvió a manifestarse en Kenya, cuando un niño danés de 10 años que viajaba con sus padres por diversas zonas del país y que también habían visitado la cueva Kitum, murió con las manifestaciones hemorrágicas de la enfermedad en el hospital de Nairobi. La cueva Kitum mantenía una nutrida población de murciélagos, planteándose desde el principio la posibilidad de que estos animales pudieran representar el reservorio del virus, aunque los estudios llevados a cabo sobre esta y otras especies habitantes de la cueva, no permitieron averiguar el origen.

En 1989, el 4 de octubre, apareció nuevamente el virus en la ciudad de Reston (estado de Virginia) en los Estados Unidos. Una empresa había importado un centenar de monos procedentes de Filipinas, que enfermaron y murieron masivamente duran-

te la cuarentena. En el *US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*, en Fort Detrick, estado de Maryland, se identificó el virus.

En el presente año, el virus Ebola hizo nuevamente aparición en el Zaire. El día 10 de mayo, la OMS hizo público en Ginebra la identidad de un brote de fiebre hemorrágica, que desde el mes de enero viene siendo observado en la localidad de Kikwit, donde se reconocen mas de un centenar de fallecidos. Entre las víctimas figuraban dos monjas italianas que trabajaban en el hospital donde al parecer se inició el foco infeccioso. En un poblado situado a unos 120 km al oeste de esta localidad, llamado Mosango, fueron diagnosticados nuevos casos.

El virus descrito inicialmente se reconoce como virus Marburgo, reservándose la denominación de virus Ebola (Ebola es un pequeño rio situado en el noroeste del Zaire) para los aislados en las epidemias de 1976 (Ebola Zaire y Ebola Sudán), como se ha dicho morfológicamente semejantes al primero pero antigénicamente distintos. Existen además diferencias antigénicas entre el virus de Ebola aislado en las dos grandes epidemias, que justifican su condicion de subtipos.

Desde el punto de vista de su virulencia medida por su capacidad letal, el más virulento es el aislado en el Zaire (tasa de mortalidad próxima al 90%) y el que menos el virus de Marburgo (tasa de mortalidad del 25%), siendo el virus Ebola Sudán de una capacidad letal intermedia (tasa de mortalidad del 53%). La variedad Ebola-Reston, la última descrita, no ha llegado a producir muertes en seres humanos.

Después de un completo estudio morfológico, morfogenético, fisicoquímico y molecular, se han situado estos virus dentro de una familia exclusiva, la familia *Filoviridae*, con dos tipos (Marburgo y Ebola) y dentro del segundo los subtipos que se han señalado, que si bien comparten epitopos, también se diferencian por otros específicos.

Los virus Marburgo y Ebola se clasifican como patógenos de nivel 4 de seguridad biológica, estando su manipulación y trabajo sometida a los más rigurosos controles.

En su forma natural, son virus filamentosos e incluso ramificados, de longitud variable (hasta 14.000 nm) y un diámetro uniforme de 80 nm. Poseen una envoltura derivada de la membrana plasmática celular y una capa de proyecciones superficiales compuesta de peplómeros de 10 nm de longitud. En su interior incluyen una molécula de RNAmc de sentido negativo. En su composición, se incluyen 7 polipéptidos, desde 24 hasta 180 kDa (en este caso, la proteína L, con actividad de transcriptasa).

La difusión del virus se produce mediante el contacto estrecho con los casos clínicos, incluyendo el contacto sexual, habiéndose comprobado en la práctica su propagación como resultado del uso de jeringuillas y agujas reutilizadas y contaminadas.

Experimentalmente se han infectado con los dos tipos del virus, monos, ratones, cobayas y hamsters, para los que son altamente virulentos, produciendo la muerte de los animales inoculados. El subtipo Sudan del virus Ebola, produce con frecuencia un tipo de infección autolimitada. Clínicamente se observa una disfunción hepatocelular, con lesiones necróticas y una muy escasa respuesta inflamatoria. Se ha demostrado una disfunción bioquímica de las células endoteliales y las plaquetas, que se asocian con la presencia de edema, efusiones múltiples, hemorragias y shock hipovolémico.

El origen en la naturaleza y la historia natural del virus continúa siendo un misterio. Aunque se supone y en la práctica se considera que ambos virus son zoonóticos y que se transmiten al hombre a partir del ciclo biológico desarrollado en los animales (y/o en los artrópodos), lo cierto es que aún se carece de pruebas que impliquen directamente a los animales. Se supone que tanto los cobayas como los monos y el hombre, se infectan casualmen-

te a partir de un ciclo en un hospedador reservorio todavía no descubierto. Con este propósito, se han llevado a cabo investigaciones muy extensas con resultados muy confusos. Aunque no se han encontrado anticuerpos ni virus en los miles de muestras estudiadas procedentes de animales, incluyendo más de 200 de monos recogidos en el Zaire y Sudán, sin embargo hasta el 18% de las muestras recogidas de seres humanos en la misma área geográfica, reaccionaban positivamente por inmunofluorescencia indirecta. Además, se han descrito reacciones de título bajo, inespecíficas, en sueros humanos recogidos de muchas zonas del mundo, incluyendo áreas donde nunca ha sido descrita la enfermedad, desconociéndose absolutamente la naturaleza de tal reactividad.

Algunos virologos consideran respecto de su origen, que es la suma de numerosas circunstancias, entre las que de modo principal cuenta el desequilibrio ambiental producido por la ruptura del ecosistema natural, como consecuencia de la invasión de nuevas tierras para el laboreo agrícola.

### **Hantavirus**

El género *Hantavirus* se sitúa en la actualidad dentro de la familia *Bunyaviridae*, compuesta de virus esféricos, de entre 90 y 100 nm de diámetro, con una envoltura lipídica cubierta de peplómeros glicoproteicos que rodea a tres nucleocápsidas helicoidales. Incluyen un genoma de tres fragmentos compuesto por ARNm de sentido negativo respectivamente denominados L (fragmento grande, que codifica para la transcriptasa), M (medio, que codifica para las proteínas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y S (pequeño, que codifica para la nucleoproteína) con 6.500, 3.700 y 1.800 nucleótidos respectivamente. Incluyen además dos proteínas de superficie (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y una proteína de la nucleocápsida (citadas antes). Dentro del género *Hantavirus*, con un solo grupo serológico, se incluyen entre 10 y 12 virus, el prototipo de los cuales es el virus Hantaan

(nombre del río Hantaan, en la región de Corea donde fue originalmente descrita la enfermedad).

A diferencia de los otros géneros del grupo, los hantavirus no se transmiten por artropodos. Todos los miembros se aíslan de roedores que mantienen la infección de forma persistente, representando los reservorios del agente, bien en la naturaleza o en las colonias de roedores de laboratorio. La difusión se lleva a cabo a través de los aerosoles de las excretas (especialmente orina) de los roedores. Los hantavirus han sido implicados como agentes de enfermedad humana en varias partes del mundo, produciendo colectivamente «fiebre hemorrágica con síndrome renal» cuyos síntomas principales incluyen fiebre y fallo renal agudo, con o sin manifestaciones hemorrágicas.

Los tres virus patógenos principales del grupo hantavirus respectivamente denominados «Hantaan», «Seoul» y «Puumala», son los agentes etiológicos de varias formas de fiebre hemorrágica con síndrome renal, y se transmiten respectivamente a partir del ratón de campo *Apodemus agrarius*, de las ratas urbanas y de laboratorio *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*, y del ratón campesino de las riberas de los ríos, *Clethrionomys glareolus*. El virus Hantaan es endémico en los países del Este, produciendo fiebre hemorrágica con síndrome renal (fiebre hemorrágica coreana) con una mortalidad del 3 al 7% (Lee *et al.*, 1976). El virus Seoul es un patógeno urbano que se aísla en todo el mundo, produciendo fiebre hemorrágica epidémica, con una mortalidad del 1 al 2% (Lee *et al.*, 1990). El virus Puumala se aísla en Europa y en Siberia, produciendo un tipo de enfermedad más benigna (nefropatía epidémica) con una mortalidad aproximada del 0,2% (Mustonen *et al.*, 1990). En el área de los Balcanes, el ratón de campo de cuello amarillo *Apodemus flavicollis* es portador de un virus denominado «Dobrava o Belgrado», denunciado como agente etiológico de un cuadro de fiebre hemorrágica con síndrome renal, de alta mortalidad (Gligic *et al.*, 1992).

## **Síndrome pulmonar por hantavirus.**

En mayo de 1993, la investigación de un grupo de muertes en residentes rurales, que tuvo lugar en el suroeste de los Estados Unidos (área de «Four Corners», la zona que rodea la frontera común de Nuevo Mexico, Arizona, Utah y Colorado), condujo al descubrimiento de un virus perteneciente al grupo Hantavirus, altamente patógeno (Nichol *et al.*, 1993; Duchin *et al.*, 1994), recientemente denominado virus «Muerto Canyon» (CDC, 1994). El agente está relacionado estrechamente con el virus Puumala y el de Prospect Hill (Hjelle *et al.*, 1994). Igualmente se produjo la descripción de un nuevo síndrome clínico, «Síndrome Pulmonar por Hantavirus», que se caracteriza por la presencia de fiebre al comienzo del proceso, seguida de la aparición repentina de edema pulmonar agudo y progresivo, trombocitopenia e hipotensión sistémica refractaria, con hemoconcentración hipoproteinemia, leucocitosis e infiltrados intestinales difusos en ambos pulmones, y con mucha frecuencia shock, que conduce a la muerte del paciente (tasa de mortalidad superior al 56%).

Hasta marzo de 1994 se habían reconocido 37 casos en los tres Estados del Sudoeste de los Estados Unidos, implicados en la epidemia. Utilizando secuencias genómicas procedentes de tejidos humanos infectados, los investigadores fueron capaces de identificar al ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) como el reservorio principal del virus. Un trabajo reciente pone de manifiesto la existencia de otro virus relacionado con el anterior, pero menos patógeno, que es portado por la rata de cola de algodón (*Sigmodon hispidus*).

La información disponible hasta la fecha pone de manifiesto que muchas características de los Hantavirus están determinadas primariamente por sus hospedadores naturales. La comparación de cepas circulantes dentro de una población local de roedores revela una deriva genética a partir de acúmulos de bases o

sustituciones, deleciones o inserciones de las mismas (Phyashin *et al.*, 1994); por otra parte, todavía no se ha investigado la presencia de estos virus en muchas especies de roedores, por lo que no puede descartarse aún la presencia de otros que seguramente permanecen sin descubrir; por otra parte, faltando el conocimiento de los factores que influyen en la virulencia de estos virus, la patogenicidad para el hombre es impredecible.

Recientemente se han descrito otros tipos de Hantavirus, incluyendo el virus Prospect Hill (ver antes), Tailandia, Thottapalayan y Tula, sin patogenicidad para el hombre y portados por distintas especies de roedores.

Los Hantavirus han sido tradicionalmente muy difíciles de cultivar, y este virus no es ninguna excepción a la regla, por lo que ha sido preciso recurrir a técnicas de Biología Molecular para obtener clones de DNA completos de los pequeños segmentos de RNA del virus directamente de tejidos humanos, procedimiento que proporciona un reactivo diagnóstico de gran sensibilidad y que puede ser ampliamente utilizado (Peters, 1994).

### **Arenavirus**

Los Arenavirus son un grupo de virus responsables de fiebres hemorrágicas, denominados así por la apariencia arenosa de la partícula que se observa al microscopio electrónico. Son un grupo de virus ARN envueltos, que replican en el citoplasma celular, sin fase nuclear ni pase por ADN intermediario en su replicación. El prototipo de la familia es el virus de la coriomeningitis linfocitaria, que posee como el resto un genoma monocatenario bisegmentado. El fragmento pequeño (S) posee doble sentido, y mientras en sentido positivo codifica para las glicoproteínas de la cubierta, en sentido negativo lo hace para la nucleoproteína. El segmento grande (L) también es ambisentido y codifica dos proteínas, una grande que es la ARN polimerasa, y

la denominada proteína Z, que es una proteína que contiene zinc y cuya acción es por el momento desconocida. Las ARN polimerasas cometen mas errores en la traducción del ARN que las ADN polimerasas, permitiendo de este modo la obtención de poblaciones muy heterogéneas de virus, lo que explica la rápida evolución de esos virus y su adaptación a los cambios ambientales. Algunos de los arenavirus producen graves enfermedades febriles y hemorrágicas. Después de un periodo de incubación mas o menos largo, invaden la mayoría de los tejidos inhibiendo el sistema inmune, que implica la aparición de anticuerpos en ocasiones 1 mes o más después de la aparición de los primeros signos clínicos. Inactivan las plaquetas y son causa frecuente de problemas neurológicos.

Los Arenavirus de descripción reciente incluyen por ejemplo el virus Guanarito, descrito en 1989 durante una epidemia en Venezuela, en una zona deforestada, en el que actua como reservorio el roedor *Sigmodon alstoni*, cuyos excrementos secos y la orina, permiten la difusión del virus por via respiratoria. El virus Sabia ha sido identificado en el estado de Sao Paulo, implicándose también en este caso a diversos roedores como reservorios. El virus Junin fué identificado en 1958 en Argentina, como responsable de un tipo de fiebre hemorrágica habitual en la pampa, favorecido por el cultivo de grandes cantidades de maíz que permitió la proliferación de sus roedores reservorios, como *Callomys musculinus* y *Callomys laucha*. Como en los casos anteriores, la inhalación de polvo contaminado con las excretas secas de los roedores, fué el procedimiento habitual de difusión. El virus Machupo apareció en Bolivia en 1952, ligado a la irrupción humana en la selva amazónica; en este caso, el reservorio roedor es *Callomys callosus*, que a diferencia de los anteriores penetra en las casas de los asentamientos humanos. En 1994, un brote de fiebre hemorrágica por este virus, produjo la contaminación de una familia entera.

El virus de la fiebre de Lassa, produce una fiebre hemorrágica descrita por primera vez en 1969 en Lassa (Nigeria), ligada a los hospitales, con brotes de alguna entidad en los años 1970 y 1976, en este último caso al norte del Zaire.

## **PATOGENOS NUEVOS O DE INTERES CRECIENTE DE LOS ANIMALES CUYA TRANSMISIÓN AL HOMBRE NO HA SIDO DEMOSTRADA**

Incluimos en esta lista, algunos de los microorganismos patógenos de los animales, de reciente aparición o cuya incidencia ha sido objeto en los últimos años de especial recrudescimiento, en los que no se ha descrito transmisión al hombre, pero cuya importancia desde el punto de vista veterinario ha alcanzado en los últimos años, cotas considerables.

### **I. BACTERIAS**

#### ***Actinobacillus pleuropneumoniae*. Pleuroneumonía porcina**

Aislado a comienzos de los años 60, a partir de lesiones neumónicas y septicemia porcina, el microorganismo actualmente denominado *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ha pasado a ser en los últimos años el patógeno respiratorio más importante de cuantos afectan a esta especie animal, y según muchos autores, uno de los patógenos más importantes del cerdo. Con toda seguridad, la producción intensiva porcina y la profusión de intercambios de animales vivos entre países o regiones de una misma nación, han jugado un importante papel en la situación actual de la pleuroneumonía porcina, el proceso producido por este microorganismo. que se encuentra difundido por todo el mundo, siendo causa de muy importantes pérdidas económicas.

En 1978, Bertschinger y Seifert describieron un microorganismo «semejante a *Pasteurella hemolytica*» que era la causa de una pleuroneumonía necrotizante porcina descrita en Suiza por vez primera, no siendo posible diferenciar esta enfermedad de la

originada por *Haemophilus pleuropneumoniae*, nombre que distinguía al agente de la pleuroneumonía porcina, aislado inicialmente por Matthews y Pattison (1961) y considerado *Haemophilus parainfluenzae*. Olander en California (1963) y Shope en Argentina (1964) habían descrito este agente bajo las denominaciones de *Haemophilus parahaemolyticus* y *Haemophilus pleuropneumoniae* respectivamente, denominación esta última que prevaleció sobre la anterior. En 1983 Pohl *et al.* llevaron a cabo estudios de hibridación ADN-ADN detectando una estrecha vecindad con *Actinobacillus lignerisii* referida no solamente a estos hechos, sino también a cuestiones relativas al tamaño del genoma y contenido en G+C, lo que justificó su propuesta de inclusión dentro del género *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*). Su propuesta incluyó igualmente la consideración de la bacteria descrita por Bertschinger y Seifert ya referida, como un nuevo biotipo del anterior, caracterizado por su independencia del factor V de coagulación de la sangre para su crecimiento.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es un cocobacilo Gram negativo, pleomórfico, capsulado, anaerobio facultativo e inmóvil. Como se ha dicho, la dependencia del factor V (NAD), diferencia dos biotipos. El primero (biotipo 1) es dependiente, siendo el segundo (biotipo 2) independiente. Ambos producen una zona de -hemólisis alrededor de las colonias en agar sangre, y en presencia de *Staphylococcus aureus*, producen efecto CAMP.

Sobre la base de antígenos polisacáridos presentes en la cápsula, se diferencian en la actualidad un total de 12 serotipos en el biotipo 1, y dos serotipos en el biotipo 2. El antígeno O también diferencia los serotipos, aunque existen epitopos comunes entre los serotipos 1,9 y 11; 3, 6 y 8; y 4 y 7. Trabajando con anticuerpos monoclonales para el serotipo 4 (Rodríguez Barbosa, 1995) y para el serotipo 1 (datos sin publicar), hemos propuesto en estos serotipos ampliar el esquema de clasificación a semejanza de lo

que ocurre en el caso del género *Salmonella*, dando entrada a los antígenos somáticos (antígeno O). Dentro de los serotipos 1 y 5, se han descrito recientemente subtipos (a y b) (Nielsen, 1986; Joli *et al.*, 1994) cuya diferencia reside en la existencia de un determinante específico.

La frecuencia de aislamiento de los serotipos varía ampliamente según la región geográfica, siendo también variable el momento de aparición. En España, los serotipos más frecuentes incluyen el 2 y el 4, aunque en la actualidad, han sido descritos todos (Gutierrez *et al.*, 1990; Gutierrez *et al.*, 1993; Gutierrez *et al.*, 1995).

Utilizando un sistema de electroforesis de perfiles enzimáticos, aplicado a un total de 135 cepas aisladas de 14 países diferentes, se ha demostrado que la estructura poblacional de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es clonal, aunque existe alta variabilidad en multilocus de los genotipos; en definitiva, aunque los aislamientos pertenecientes a un mismo serotipo son genéticamente muy diversos, los pertenecientes al serotipo 1, que son especialmente patogénicos, forman un cluster distinto de clones estrechamente relacionados (Musser *et al.*, 1987). Moller *et al.* (1992) examinaron la diversidad genética de 250 aislamientos obtenidos en Dinamarca, procedentes de pulmones de cerdos con signos de pleuropneumonía, y de tonsilas de animales aparentemente sanos, mediante el mismo procedimiento anterior, observando que la recombinación cromosómica o es muy limitada entre los clones, o esta no existe. De la totalidad de los aislamientos estudiados, el 66% pertenecía a 3 tipos electroforéticos del total de los 37 identificados en el estudio. De acuerdo con el trabajo de Musser *et al.* antes citado, el serotipo 1 constituye un grupo genéticamente homogéneo, aunque existen excepciones, y las estrechas interrelaciones observadas entre los serotipos 1 y 9 se corresponden con los hallazgos de otros estudios realizados. Los serotipos 7, 8 y 12 muestran más diversidad genética que el resto de los

serotipos. En resumen pues, dentro de la estructura clonal de este microorganismo (Los aislamientos de las tonsilas pertenecían al mismo tipo electroforético que los aislamientos obtenidos de los pulmones, y estos tipos eran los mismos obtenidos de otras partes del mundo), existe considerable diversidad genética interserotipo, especialmente en algunos de ellos como se ha señalado. .

*Actinobacillus pleuropneumoniae* se difunde principalmente por vía aérea, por contacto directo de cerdo a cerdo o por gotitas si la distancia entre animales es corta. De igual modo, material de lesiones sometido a congelación, no permite la recuperación de microorganismos al cabo de 1 año (Gutierrez *et al.*, 1992). No puede descartarse la transmisión pasiva, mediante exudados contaminados procedentes de cerdos en fase aguda. En cultivo puro los microorganismos sobreviven corto tiempo en el medio ambiente, pero protegidos por mucus u otro tipo de materia orgánica, pueden permanecer infectantes durante varios días. Los animales que sobreviven a la enfermedad aguda pueden convertirse en portadores (Nicolet, 1992), localizándose principalmente en las lesiones necróticas y/o en las amígdalas (mas raramente pueden aislarse de las cavidades nasales); en algunas infecciones subclínicas, el microorganismo se acantona en tonsilas o cavidad nasal.

El contagio se produce por via respiratoria, aunque se ha señalado que después de la inoculación intravenosa con bajas concentraciones del serotipo 2, el agente se aisló en la necropsia solamente del tracto respiratorio, por lo que de confirmarse este hecho no podría excluirse la posibilidad de que los pulmones pudieran ser infectados igualmente a través del torrente circulatorio.

Ambos biotipos y todos los serotipos son capaces de originar graves enfermedades e incluso la muerte de los animales, aunque existen diferencias de virulencia entre los biotipos y serotipos. Con carácter general, el biotipo 1 es mas virulento que

el 2, y dentro del primero los serotipos 1, 5a, 9 y 10 son los que más, aunque según Dom y Haesebrouk (1992), este hecho no ha podido ser confirmado en condiciones experimentales.

Se está de acuerdo en la actualidad, en que la patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es el resultado de la suma de múltiples factores. A la participación del hospedador y del ambiente del punto de infección, se suman una serie de factores de virulencia en los que se ha centrado en los últimos años la mayor parte de las investigaciones. Brevemente resumiremos las características más notables de los principales factores de virulencia de esta bacteria.

Cápsula: Todos los serotipos poseen cápsula y su estructura y composición han sido ya determinadas en todos ellos (oligosacáridos de repetición derivada -Jansen, 1994). Su grosor es variable según el serotipo, y aunque purificada es biológicamente inerte, *in vivo* desempeña sin duda una importante función en la propia virulencia (mutantes acapsulados o con cápsulas de menor grosor, no reproducen experimentalmente las mismas lesiones que las que origina la cepa salvaje) (Rosendal y McInnes, 1990). Además la cápsula es inmunogénica induciendo una respuesta que suprime la mortalidad en la infección experimental, aunque no la producción de lesiones pulmonares ni la cronicación del proceso (Inzana *et al.*, 1988). De forma pasiva, la cápsula representa la protección principal frente a las defensas del hospedador, particularmente frente a la fagocitosis (Rycroft y Cullen, 1990; Udeze y Kadis, 1992) y la lisis producida por el sistema del complemento. Los anticuerpos anticapsulares son opsoninas que representan un importante papel en la protección parcial derivada del uso de bacterinas.

Lipopolisacárido (LPS): A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los Gram negativos que producen enfermedad respiratoria, *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede presentar perfi-

les de LPS liso, parcialmente rugoso o rugoso, todo ello en función del serotipo y aún de la cepa que se considere (Byrd y Kadis, 1989; Perry *et al.*, 1990).

La actividad biológica del LPS es similar a la de otros Gram negativos, produciendo lesiones leves a nivel pulmonar, sin aparición de hemorragias ni focos necróticos, por lo que se considera que este factor contribuye al cuadro clínico, pero si solo es incapaz de reproducir el cuadro característico. El LPS constituye una de las principales adhesinas, uniéndose específicamente al mucus traqueal (Paradís *et al.*, 1994) permitiendo que se inicie el proceso de colonización.

Proteínas de la membrana externa: Se han identificado varias, pudiendo aparecer en condiciones de bajo nivel ambiental de hierro o cuando se incorpora maltosa, predominando tres tipos principales, de 17, 32 y 42 kDa (Jansen, 1994). Los determinantes antigénicos de las proteínas de membrana externa son junto con los del LPS y proteínas del citosol bacteriano, los principales responsables de las reacciones cruzadas que se observan entre los distintos serotipos e interespecíficos. La inmunización con una lipoproteína de membrana externa de 40 kDa aproximadamente, evita la muerte de los animales, pero no impide la aparición de lesiones pulmonares, de las que se aísla sin dificultad la bacteria (Gerlach *et al.*, 1992).

Proteínas ligadas a la transferrina: *Actinobacillus pleuropneumoniae* es capaz de adherir directamente transferrina porcina mediante la actuación de proteínas de membrana externa que se comportan como receptores cuya expresión solo tiene lugar en condiciones de niveles restrictivos de hierro. Se han descrito tres proteínas diferentes (Tbp-1, Tbp-2 y Tbp-3) (*transferrin binding proteins*), de 60, 62 y 65 kDa de peso molecular, específicas para la transferrina del cerdo. Probablemente las primeras son proteínas de transporte, mientras que las segundas permane-

cen unidas a la membrana externa a través del lípido N-terminal. El procedimiento de captación de hierro implicaría primero la unión y posterior eliminación del hierro desde la transferrina en la superficie de la bacteria, todo ello mediante una acción coordinada de ambas proteínas.

Los sistemas de captación de hierro pueden representar un mecanismo de virulencia relevante, ya que posibilitan atender las necesidades de hierro en un ambiente en el que este elemento libre se encuentra en niveles muy bajos. Se han llevado a cabo ensayos de inmunización con la proteína de 60 kDa, comprobando que se confería una protección limitada frente a las cepas homólogas

Proteasas: *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce proteasas que degradan la gelatina porcina, la IgA y la hemoglobina, lo que en términos prácticos facilita la diseminación del microorganismo en las mucosas, además de que la degradación de la hemoglobina puede constituir un mecanismo adicional de captación de hierro (Negrete-Abascal, 1994).

Citotoxinas: Constituyen un conjunto de proteínas miembros de la familia de toxinas RTX<sup>10</sup> de toxinas formadoras de poros, que aunque la mayoría son activas frente a eritrocitos, pudiendo con ello ser distinguidas como hemolisinas, otras carecen de esa actividad, no siendo por ello menos importantes. En general, son activas frente a macrófagos alveolares y neutrófilos porcinos, son termolábiles, inactivándose también por el calor, formol y enzimas proteolíticas, y se producen mediada la fase de crecimiento logarítmico. Las dos primeras muestran actividad hemolítica (Apx I y II), mientras que la tercera (Apx III) solamente muestra actividad citotóxica.

Apx I posee un peso molecular aproximado de 105 kDa y presenta muchas características en común con la -hemolisina de *Escherichia coli*. Es producida por los serotipos 1,5a, 5b, 9, 10 y

11 del biotipo 1. Apx II es débilmente hemolítica y citotóxica, presenta un peso molecular de 103 kDa y la producen todos los serotipos del biotipo 1, con excepción del 10, así como los serotipos del biotipo 2. Esta actividad tóxica, está muy relacionada con la leucotoxina de *Pasteurella hemolytica*. La Apx III no es hemolítica, posee un peso molecular de 120 kDa y solamente la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 del biotipo 1.

Los determinantes genéticos que codifican para las toxinas RTX suelen ser operones formados por 4 genes contiguos dispuestos en el orden C,A,B y D (Welch, 1991). En el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae* también se han descrito operones que contienen solo dos de estos genes.

Las toxinas RTX constituyen uno de los principales elementos inmunógenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se consideran los principales factores de virulencia. Algunos autores han sugerido que las toxinas de referencia serían las responsables de las lesiones necrótico-hemorrágicas características de la pleuroneumonía (Inzana, 1988; Udeze *et al.*, 1987). Recientemente Tascon *et al.* (1994) ha demostrado mediante mutantes no hemolíticos (no producen ni Apx I, ni Apx II) y débilmente hemolíticos (solo producen Apx II) del serotipo 1, obtenidos mediante un procedimiento de mutagénesis por transposón (Tascón *et al.*, 1993), la implicación de estos factores en la virulencia del agente, en un modelo experimental (ratón) y en el hospedador natural, midiendo la presencia de lesiones y la capacidad de producir la muerte de los animales.

También se ha demostrado su implicación en la inducción de inmunidad protectora, habiéndose preconizado el uso de estos productos como componentes básicos en el desarrollo de vacunas contra la pleuroneumonía porcina (Bathia *et al.*, 1991; van den Bosch *et al.*, 1992).

Factor de permeabilidad: Se ha descrito en los serotipos 1 y 5, caracterizándose por la producción de edema en conejos después de la inyección intradérmica (Lallier *et al.*, 1987). Es un producto inestable que no se detecta de forma continua en los sobrenadantes de los cultivos.

Fimbrias: Fueron descritas por primera vez en 1988 por Inzana *et al.* Utrera y Pijoan (1991) señalaron la presencia de fimbrias peritricas en el 45% de los aislamientos, que se perdían al tercer pase en el laboratorio en medios carentes de sangre.

Factor CAMP: Es una cohemolisina de naturaleza proteica, de 27 kDa de peso molecular, cuyo gen responsable *cfp* fue identificado y clonado por Frey *et al.* (1989). Recientemente sin embargo (Jansen *et al.*, 1995) se ha señalado que el efecto CAMP es causado únicamente por las toxinas RTX al actuar sinérgicamente con fosfolipasas o esfingomielininas producidas por *Staphylococcus aureus*, quienes hidrolizarían los fosfolípidos de la membrana de los eritrocitos y harían a estos más sensibles a la hemólisis por las toxinas Apx. En cualquier caso, su papel en la virulencia aún no ha sido establecido.

## II. VIRUS

### *Parvovirus felino*

La mutación genética es sin duda responsable de la aparición del parvovirus canino, obtenido en 1978 a partir del virus de la panleucopenia felina, viejo conocido de los microbiólogos como causa de un cuadro de leucopenia y enteritis en gatos y mapaches y que en los años cuarenta fué descrito también como causa de una grave enfermedad productora de alta mortalidad en los visones, aunque clasificado como una variante virulenta del primero, dado que ni bioquímica ni serológicamente podía apreciarse diferencia alguna con él. Cuando fué descrito el parvovirus canino resultó indiferenciable del anterior y fue clasificado como

parvovirus canino tipo 2. Este virus fue responsable de una auténtica pandemia de resultados devastadores, que afectó prácticamente a las poblaciones caninas de todo el mundo; dotado de una contagiosidad extrema, el parvovirus canino mató en los primeros años de infección a miles de perros de todo el mundo.

La hipótesis acerca del origen de este virus y más ampliamente aceptada, sostiene la aparición a partir de un virus de los gatos (Panleucopenia felina), por mutación natural (Parrish. 1990 y 1993). Según otros, el virus podría proceder de un virus adaptado a un carnívoro distinto como es el caso del zorro ártico (Veijaleinen, 1988), o podría haberse generado también a partir de células caninas contaminadas con el virus de la panleucopenia felina, que después de su adaptación *in vitro*, habrían sido distribuidas alcanzando a los hospedadores naturales susceptibles (los perros) a partir de vacunas contaminadas ( Siegl, 1984; Fenner, 1992); ésta última hipótesis, que pareció la más fundamentada inicialmente, no ha podido ser confirmada todavía en los estudios realizados en los últimos años.

Si la evolución tuvo lugar a partir de un virus del gato hasta un nuevo virus del perro, el virus habría adquirido la capacidad para infectar, replicarse y luego eliminarse al ambiente a partir de los perros. Estudios previos han puesto de manifiesto que el virus de la panleucopenia felina es capaz de replicarse en los perros, aunque de un modo restringido, pues solamente se observa a nivel del timo y médula ósea, pero no en el intestino o en los ganglios mesentéricos, que son como es sabido los principales órganos diana del parvovirus canino y los que con mayor eficiencia se adaptan a la posibilidad de eliminar el virus. No obstante, durante la evolución del ancestro del parvovirus canino, este habría conseguido esa capacidad para infectar el intestino, como requisito que garantizase su capacidad de eliminación y difusión entre las poblaciones de perros.

Examinando recombinantes obtenidos a partir del virus de la panleucopenia y del parvovirus canino ha podido observarse que las proteínas de la cápsida determinan el rango de hospedador de ambos virus tanto *in vitro* como *in vivo* (Parrish, 1991; Chang *et al.*, 1992; Truyen *et al.*, 1994). Estudios llevados a cabo con posterioridad han revelado que los aminoácidos 80, 564 y/o 568 de la secuencia del virus felino, resultan esenciales para proporcionar al virus la capacidad de replicación completa en los gatos. Si solamente esta presente uno de estos cambios, el virus resultante es capaz de replicarse, aunque de un modo restringido. Cuando ambas regiones están modificadas, el virus se comporta igual que si se tratara del parvovirus canino tipo salvaje y no es capaz de replicarse en los gatos (Truyen *et al.*, 1994).

Tres aminoácidos, los 93, 103 y 323 son los que determinan aparentemente el rango de hospedador del parvovirus canino. Solamente cambiándoles en la secuencia del virus de la panleucopenia felina, se obtiene un nuevo virus que infecta el intestino canino y los ganglios linfáticos mesentéricos, y que se elimina en las heces hasta títulos comparables a los del parvovirus canino salvaje. Además, el aminoácido 93, crea un epítipo específico, que hace que el virus correspondiente pueda ser serológicamente caracterizado como parvovirus canino.

El análisis de la secuencia del gen que codifica para la proteína de la cápsida de numerosos parvovirus aislados de casos clínicos, pone de manifiesto que el parvovirus felino forma dos clusters diferentes formados por el virus que se aísla de gatos, mapaches y visones, y otros virus que se aíslan de perros y mapaches. Estos cluster se separan por 12 cambios de nucleótidos conservados, seis de los cuales poseen capacidad de codificación. Tres de estos son funcionalmente importantes en la determinación del rango de hospedador de los felinos y los otros tres lo son para los caninos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además,

el aminoácido 80 se define al menos como una parte de un epítipo específico para el virus de la panleucopenia felina, mientras que el aminoácido 93 se define como un epítipo específico para el parvovirus canino. Un virus aislado a partir de un zorro ártico en Finlandia parece ser un intermediario entre el virus de la panleucopenia y el parvovirus canino.

El parvovirus canino continua mostrando signos de evolución. Desde su aparición a mediados de los años 70, se han descrito dos nuevos tipos antigenicos que se denominan 2a y 2b, y cada uno de los nuevos tipos de virus ha reemplazado casi completamente a los virus mas antiguos mediante mecanismos poco comprendidos, pero que en parte al menos incluyen un procedimiento de selección inmunológica, como lo demuestra el hecho de que cada nuevo tipo antigénico ha perdido un epítipo neutralizante comparado con la cepa original (Strasheim *et al.*, 1994).

### **Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino**

El denominado Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (SRRP) se denunció y describió por vez primera en Estados Unidos en 1987, desde donde se difundió a Canadá. En 1990 hizo su aparición en Alemania desde donde a través del comercio de animales vivos se transmitió a la práctica totalidad de los países europeos (con pocas excepciones, como Suiza, Polonia o Italia), incluyendo España, donde en enero de 1991 hizo su aparición en Huesca. En la actualidad puede afirmarse que con excepción de Australia, la enfermedad está difundida por todo el mundo. Muchas de las denominaciones utilizadas en estos años, aluden a las principales manifestaciones de la enfermedad, como «aborto enzootico tardío», «síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino», «síndrome de infertilidad y respiratorio porcino», «enfermedad azul».

Aunque al principio se especuló con posibles etiologías bacterianas (*Leptospira interrogans bratislava*, *Chlamidia psitacci* o *Campylobacter*), e incluso en relación con una intoxicación por micotoxinas, pronto se estuvo de acuerdo en su etiología vírica, centrándose la polémica respecto de los posibles tipos de virus candidatos a figurar como agente de este proceso. Se señaló la posibilidad de que se tratase de una variante neumotrópica del virus de la encefalomiocarditis, o bien un parvovirus porcino, e incluso el virus de la enfermedad de Aujeszky. Wensvoort *et al.*, en 1991, lograron el aislamiento de un virus diferente a partir de muestras de casos clínicos que incluían material de pulmón, cerebro, tonsilas y otros, procedentes de lechones enfermos, así como de plasma y suero de cerdas igualmente enfermas. Consiguieron transmitir y reproducir la enfermedad, denominando al agente «virus Lelystad».

El virus es pleomórfico al microscopio electrónico, aunque la forma más común consiste en viriones esféricos, con un tamaño que va desde 48 a 80 nm, con una zona central electrodensa y rodeando una envuelta membranosa. Cultiva preferentemente sobre macrófagos alveolares porcinos, circunstancia que le relaciona con otros virus como el de la lactato deshidrogenasa del ratón, el de la arteritis vírica equina o el de la enfermedad hemorrágica de los monos, a los que también se aproxima en sus características morfológicas y patrones proteicos. En 1993, Janneke *et al.*, confirmaron que se trataba de un virus con ARN, que incluye un total de 8 zonas de lectura abiertas que codifican para la polimerasa vírica (zonas 1a y 1b), para proteínas asociadas a la membrana (zonas 2 a 6) y para la nucleocápsida (zona 7). Los estudios de secuencias justificaron la propuesta de este agente dentro de la familia *Arteriviridae*.

El virus se difunde mediante el contacto estrecho, a través de la vía aérea, e indirectamente utilizando vehículos inertes. También se considera la posibilidad de que pueda hacerlo a través del

semen en la fase aguda y no se descarta la vía hematógica. El virus se transmite verticalmente de la madre al feto.

Recientemente se han descrito animales con anticuerpos en ausencia de cualquier tipo de sintomatología clínica, sugiriéndose de la existencia de cepas atenuadas o poco patógenas, probablemente consecuencia de la variación antigénica del virus, como parte de un proceso de adaptación a hospedador. Respecto de esto, se ha referido la abundancia de animales seropositivos, que en algunos territorios de los Estados Unidos, podrían alcanzar al 30% de las explotaciones investigadas.

### **Coronavirus felinos**

El coronavirus entérico felino y el virus de la peritonitis infecciosa felina son miembros de la superfamilia de virus semejantes a los coronavirus y manifiestan las características típicas de otros coronavirus, como un ARN mc de aproximadamente 30 kilobases y polaridad positiva. Las glicoproteínas de la envoltura se presentan como proyecciones en forma de pétalos de flores o peplómeros y su funcionalidad reside en la unión del virus a los receptores situados en las células hospedadoras susceptibles (Olsen, 1993).

Las infecciones por coronavirus están muy difundidas entre las poblaciones de gatos de todo el mundo, habiéndose señalado que el 85% o más de animales investigados presentaban anticuerpos específicos (Hoskins, 1993). Ambos virus están relacionados antigénicamente de forma estrecha y generalmente inducen estados de portador asintomático en los individuos adultos. Las cepas virulentas pueden originar sin embargo un tipo de enfermedad con manifestaciones gastrointestinales, serositis fibrinosa y vasculitis diseminada, conocida como peritonitis infecciosa felina. Las cepas de baja virulencia inducen habitualmente infecciones persistentes sin manifestaciones clínicas.

La peritonitis infecciosa felina se diagnosticó por primera vez en los años sesenta, habiéndose sugerido que este virus pudo haber aparecido como un virus nuevo como consecuencia de un proceso de recombinación entre otros coronavirus, señalándose que el candidato mas importante a este respecto podría ser el virus de la gastroenteritis transmisible porcina, como lo demuestra la existencia de una interrelación genética manifiesta entre ambos virus que justifica que el coronavirus felino pueda inducir experimentalmente trastornos gastrointestinales en lechones, y que el virus de la gastroenteritis transmisible porcina, sea capaz de replicarse en gatos sin producir trastornos clínicos. Comparando las secuencias se observa que entre los aminoácidos 275 y 1447, en el extremo 3' terminal, la homología del gen que codifica para los peplómeros es superior al 90%, mientras que entre los aminoácidos 1 al 274, la homología es inferior al 40%. Todo ello sugiere que el coronavirus felino podría haber surgido por recombinación intertípica entre el virus de la gastroenteritis infecciosa porcina y un coronavirus desconocido todavía, que bien pudiera ser el coronavirus entérico felino (Pedersen *et al.*, 1991).

Análisis recientes de la organización genómica y de las estrategias de replicación indican claramente que los géneros corona, toro y arterivirus divergen todos ellos de un ancestro común (Snijder y Horzinek, 1993). La prueba mas evidente para esta evolución es la homología de secuencias en el gen de la replicasa de los tres géneros.

### **Morbillivirus de los delfines y del moquillo de las focas**

El género *Morbillivirus* pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, de virus con una sola cadena de ARN, envueltos y con polaridad negativa. Desde 1988 se han venido describiendo muertes en focas (*Phoca vitulina*) en aguas del noroeste europeo y delfines (*Stenella coeruleoalba*) (1990-91) (Domingo *et al.*, 1990) en el Mar Mediterráneo en los que se han identificado

morbillivirus como causa primaria de un tipo de enfermedad epizootica que ha llamado considerablemente la atención de todos los países.

Estudios de biología molecular llevados a cabo sobre el virus aislado de la foca europea han puesto de manifiesto que se trata de una especie desconocida de morbillivirus, que se ha denominado virus del moquillo de las focas (PDV-1), el cual parece estrechamente relacionado con el virus del moquillo canino, aunque diferenciable de aquél mediante técnicas de serología clásica (Harder *et al.*, 1993). Otros morbillivirus aislados de focas en el lago Baikal, parecen por el contrario ser casi idénticos al virus del moquillo canino y se han denominado PDV-2.

La secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de membrana del PDV-1, mediante la cual el virus se une a las células hospedadoras, posee un 74% de identidad con la del virus del moquillo canino.

El origen del PDV-1 no puede explicarse de modo sencillo, como que haya surgido como una variante con distinto hospedador, del virus del moquillo canino, aunque ambos virus posean un ancestro común. Sin embargo, una similaridad del 97% de la secuencia de aminoácidos entre la glicoproteína de fusión ( $F_0$ ) de los virus del moquillo canino y PDV-2, contrasta con el 86% entre el PDV-1 y el PDV-2, sugiriendo que este último puede haber evolucionado a partir del virus del moquillo por transmisión interespecie reciente desde los carnívoros terrestres a los marinos (Visser *et al.*, 1993).

Los morbillivirus aislados de cetáceos como las marsopas (cerdos de mar) en el Mar del Norte y de los delfines del Mar Mediterráneo, se agrupan en otra entidad nueva e independiente, en el género *Morbillivirus*, en este caso estrechamente relacionada con los morbillivirus de la peste de los pequeños rumiantes, mas que con el virus del moquillo canino o el de las focas. En

base al alto grado de divergencia dentro un fragmento génico que codifica para una fosfoproteína de estos nuevos virus respecto de los anteriores (PDV y otros), se ha sugerido que estos virus habrían circulado separadamente en algunas poblaciones de cetáceos durante un largo periodo .

Además de lo anterior, se han recogido nuevos datos que prueba la reciente aparición de variantes de morbillivirus, a nivel de biotipo, como consecuencia de mutaciones.

### **Lentivirus de felinos y de simios**

Los lentivirus animales se agrupan dentro de la familia *Retroviridae*, en el género *Lentivirus*, todos ellos cercanos al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En relación con el carácter emergente aquí estudiado, hemos de referirnos al menos a los lentivirus de los monos y de los felinos. La investigación de este grupo de agentes ha estado en todo punto impulsada y favorecida por la propia de la etiología del SIDA humano, pues cada vez más evidencias apuntan al origen interrelacionado de estos microorganismos.

El virus de la inmunodeficiencia felina fué aislado inicialmente por Pedersen en 1987 a partir de gatos que manifestaban signos clínicos de inmunodeficiencia. Su interés actual, con independencia de su relación patogénica con su hospedador natural (el gato), reside en su condición de modelo animal para el estudio del SIDA humano, en especial en cuanto se refiere a las investigaciones sobre quimioterapia antivírica.

El virus de la inmunodeficiencia felina se ha descrito en todo el mundo a partir de gatos, y la presencia de anticuerpos en las poblaciones de este felino varían entre el 1 y el 30%. A partir de aislamientos procedentes de regiones diversas de América, Europa y Asia, se han llevado a cabo estudios de comparación de la secuencia de nucleótidos del DNA, poniendo de manifiesto que

el genoma de este virus posee una organización similar a la del virus HIV y otros lentivirus (Spencer *et al.*, 1992). Es de interés señalar que existe también reactividad antigénica cruzada entre la principal proteína de la capsida del virus felino, que está codificada por el gen *gag* y la de otros lentivirus tales como el virus maedi-visna, el virus de la artritis-encefalitis caprina y el virus de la anemia infecciosa equina. Aunque todos estos virus exhiben una fuerte especificidad de especie y no crean ningún tipo de riesgo para el ser humano, las interrelaciones antigénicas sugieren una evolución ancestral común. Mientras que el gen *gag* de diferentes aislamientos del virus de la inmunodeficiencia felina parece ser altamente conservado, los análisis de secuencia de los genes *env* de diferentes aislamientos clínicos procedentes de América, Europa y Japón, revelan una importante variabilidad de los grupos. Junto a esta variación en la secuencia, sin embargo, la comparación estructural de la glicoproteína de la envoltura, manifiesta también regiones conservadas entre los aislamientos. Un estudio filogenético de las secuencias de los genes *env* y *gag* ha revelado que las secuencias RNA del virus de la inmunodeficiencia felina forma claros grupos geográficos y que el aislamiento procedente del Japón representa un subgrupo diferente de lentivirus felinos, con una homología de aminoácidos del 77% para el gen *env* y del 92% para el gen *gag* (Rigby *et al.*, 1993). Esta variedad de grupos filogenéticos puede estar relacionada con el intenso comercio mundial de gatos para compañía.

A partir de primates no humanos se han aislado también un diverso número de virus de inmunodeficiencias, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia de los macacos (SIV<sub>MAC</sub>), de los monos «Sooty mangabeys» (*Cercocebus atys*) (SIV<sub>SM</sub>), el del mono verde africano (SIV<sub>AGM</sub>) o el de los mandriles (SIV<sub>MND</sub>). El virus SIV<sub>CPZ</sub>, recientemente descrito a partir de un chimpancé en Gabón, está estrechamente relacionado con el HIV-1. Todos estos virus parecen ser apatógenos para sus hospedadores prima-

rios, desarrollando la enfermedad únicamente en animales de América, Europa o Asia o los que se mantienen cautivos en centros de investigación, frente a los que aún no se han adaptado, aunque las razones exactas de este comportamiento son desconocidas por el momento. Varios estudios serológicos han puesto de manifiesto que el índice de infección de los monos de Africa y Asia oscila entre el 1-40%; en un estudio llevado a cabo por Essex *et al.* sobre diversas especies de monos africanos en libertad y cautividad a partir de miles de muestras, entre el 30-70% de las muestras de mono verde africano presentaban anticuerpos, sin presencia de signos de inmunodepresión o SIDA.

Existe un cierto paralelismo entre la diferente sensibilidad ante el SIDA de mono verde y macacos y la diferente sensibilidad ante los HIV de chimpances y humanos. Los chimpances son los únicos animales que sufren la infección experimental por HIV aislados de pacientes con SIDA aunque en ellos la enfermedad no es letal.

Los virus SIDA (HIV-1 y HIV-2) y los virus SIV forman un complejo que muestra diferentes grados de similaridad. Los dos subtipos de HIV se sitúan conjuntamente con diferentes SIV en grupos o clusters distintos. El HIV-2 se sitúa conjuntamente con los SIV<sub>SM</sub> y SIV<sub>MAC</sub>, y el HIV-1 lo hace con el SIV<sub>CPZ</sub>. Los virus SIV son también muy similares en su comportamiento a los virus HIV: infectan al mismo subgrupo de células T (CD4) y las propiedades biológicas y bioquímicas de sus proteínas muestran un notable parecido. Anticuerpos procedentes de enfermos humanos producen reacciones cruzadas con las proteínas del virus SIV (en particular frente a las principales proteínas de la nucleocápsida, siendo sin embargo la reacción poco evidente frente a las glicoproteínas de la envoltura, todo lo cual como es sabido en el caso de los retrovirus, representa una característica de grupo, pues las proteínas internas de estos virus son las más conservadas), y a la inversa. Estas interrelaciones constituyen la base para la formu-

lación de hipótesis y teorías acerca de la aparición del HIV como resultado de una transmisión interespecie desde los primates no humanos africanos, al hombre. Este planteamiento parece muy verosímil, al menos en el caso del HIV-2, por varias razones:

1) Se ha visto que los monos africanos están enzoóticamente infectados con SIV. Aproximadamente el 10% de las capturas de *Cercocebus atys* y el 20-50% de las de mono verde africano, están infectados con SIV<sub>SM</sub> o SIV<sub>AGM</sub> respectivamente (Nathanson *et al.*, 1993).

2) SIV y HIV-2 aunque poseen alguna diversidad, están estrechamente relacionados desde el punto de vista genético, y de hecho es imposible diferenciar los aislamientos de uno y otro a partir de la secuencia de nucleótidos (no así en el caso del HIV-1). Hahn (1990) refiere el aislamiento de un HIV-2 de un liberiano, con un curso asintomático, que resultó absolutamente indistinguible de las cepas de SIV, resultando imposible decidir si su origen era humano o simio.

3) Geográficamente existe una gran correlación entre las regiones donde se presentan HIV y SIV.

4) En estas áreas geográficas es común un contacto estrecho entre monos y seres humanos, y los primeros poseen importancia como fuente de carne para la alimentación de los nativos.

5) Los aislamientos de HIV-2 se ha visto que son diversos, lo que indica que una infección accidental aislada de un humano, mediante sangre de mono infectada y la difusión subsiguiente dentro de la población humana, es altamente improbable. Mas bien, las poblaciones de *Cercocebus* parecen ser un reservorio natural para varias cepas de HIV-2, las cuales han sido consideradas naturalmente virus zoonóticos. HIV-1 y HIV-2 resultan diferente en su poder patógeno; aunque ambos infectan el mismo tipo de células (T) uniéndose a los receptores CD4, pueden encontrarse diferencias a nivel genético y proteico. El gen *vpr* no

aparece en HIV-2 ni en los SIV, especulándose que la proteína que expresa, de 16 kDa, esté relacionada con la virulencia. Contrariamente en HIV-1 no aparece el gen *vpx*, que expresa una proteína de 12 kDa, para la que también se sugiere un efecto depresor sobre la virulencia, lo que justificaría la menor virulencia de HIV-2 y SIV respecto de HIV-1.

HIV-1 y HIV-2 muestran homología de secuencias en los genes *pol* y *gag*, pero difieren fuertemente en el gen *env* y en el número y organización de sus genes reguladores. Existe además una amplia variabilidad genética entre las cepas de ambos tipos; HIV-1 se distribuye en todo el mundo, mientras que HIV-2 parece estar confinado en el oeste africano.

Este escenario para la evolución del HIV-2 a partir de los primates no humanos, todavía hipotético, no explica sin embargo la evolución del HIV-1. Aunque un aislamiento de virus SIV estrechamente relacionado pudo cultivarse a partir de un chimpancé del Gabón (Huet *et al.*, 1990), faltan evidencias serológicas acerca de una difusión amplia de la infección en los chimpancés del Oeste africano. Solamente en dos chimpancés entre varios cientos investigados, pudo comprobarse que poseían anticuerpos frente al virus HIV-1. En resumen pues, el papel de los chimpancés permanece todavía confuso, resultando sin embargo una cuestión de la máxima importancia para la comprensión de la intervención que los grandes simios han desempeñado en la evolución del HIV1.

La base para la aparición de los HIV tuvo que ser muy probablemente un cambio en el rango de hospedador, seguido de la difusión dentro y fuera de Africa, motivado con toda seguridad por cambios profundos en las circunstancias sociales. Parece que el HIV se difundió en Africa solo muy recientemente, al comienzo de los años 70. Las investigaciones serológicas retrospectivas sugieren que el HIV-1 y el HIV-2 emergieron por separado, aproximadamente al mismo tiempo pero en distintas regiones geográficas de Africa. HIV-1 apareció en el Sur y Este de Africa, mientras que el HIV-2 lo hizo claramente en el Oeste de Africa.

Si asumimos la aparición de ambos virus humanos desde diferentes ancestros en primates no humanos, y que este hecho tuvo lugar aproximadamente al mismo tiempo, la aparición paralela y súbita resultaría altamente improbable, a no ser que existiese alguna razón común implicada en ella. Desde este punto de vista, se considera que algunos hechos circunstanciales podrían situarse en esta motivación: uno de ellos podría ser que en los años sesenta hubo una gran exportación de monos africanos a Europa y Estados Unidos, lo que evidentemente implicó la extensa manipulación correspondiente de los animales; además, en estos años hubo también un incremento importante en la vacunación en países del tercer mundo, que implicó el uso generalizado de jeringuillas que no se desinfectaban con regularidad después de ser utilizadas. Por otra parte, el amplio uso de la vacuna contra la poliomielitis, producida en células Vero, de origen simio, pudo haber sido la causa de difusión de estos lentivirus como se ha señalado a propósito del SV40, a consecuencia de la contaminación de algunos lotes con ellos.

Para cualquiera de estas teorías sin embargo, no existe por el momento ninguna prueba definitiva. Puede darse sin embargo un escenario facilitador, pero la aparición paralela de los dos lentivirus humanos resulta muy improbable. En qué momento emergieron estos virus, o cuándo se separaron los linajes humano y simio, parecen todavía cuestiones muy contradictorias. Las estimaciones más aceptadas basadas en los análisis de secuencias de diferentes genes de lentivirus, sugieren que tal separación pudo tener lugar aproximadamente hace ahora 40-200 años (Querart *et al.*, 1990). El origen concreto del HIV-1 es difícil de imaginar; Gallo y Montagnier (1988) y Temin (1993) han sugerido sobre la base de estudios de divergencia de cepas y la tasa probable de mutación, que la infección del hombre pudo haberse producido hace ahora entre 20 y 100 años, lo que por otra parte no distorsiona el conocimiento epidemiológico actual del SIDA (Suárez, 1993).

El HIV-2 pudo haber infectado al hombre en una época todavía mas reciente, teniendo su origen muy probablemente en otras especies de virus SIV (en especial SIV<sub>AGM</sub>)

### **Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo**

En la primavera e invierno de 1984 aparecieron varios brotes de una enfermedad aparentemente nueva en los conejos en la provincia de Jiangsu, en la República Popular China. El cuadro clínico incluía de modo característico hemorragias en el sistema respiratorio, hígado, bazo, músculo cardiaco y ocasionalmente en los riñones. El periodo de incubación fué de 2 a 3 días, con una morbilidad del 100% y una tasa de mortalidad en adultos por encima del 90%. En 1986 la enfermedad se describió en Italia y a partir de entonces se difundió con rapidez por toda Europa incluyendo Francia, Alemania y más recientemente en el Reino Unido, transmitiéndose fácilmente a partir del comercio de animales vivos o productos derivados. La enfermedad también ha sido descrita en México y Africa. En España la enfermedad fué descrita en 1988 (Arguello *et al.*, 1988) a partir de muestras de animales procedentes de diferentes regiones geográficas.

La carne de animales infectados, particularmente si se congela a -20°C es considerada ser una fuente significativamente importante de virus infeccioso.

Después de abundantes discrepancias iniciales, el agente etiológico se considera un calicivirus o una partícula semejante a un calicivirus (Parra y Prieto, 1990; Park *et al.*, 1993) de un tamaño comprendido entre 30 y 35 nm, sin envuelta, con depresiones en su superficie en forma de cúpula o calix del que únicamente se ha descrito un serotipo de origen común y reciente. Una proteína de 60 kDa resulta polipeptido principal, mientras que otras de 20, 85, 56 y 40, se consideran componentes secundarios, de menor interés.

El virus, muy infeccioso, produce hemaglutinación de eritrocitos humanos O, e induce la aparición de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación que son útiles en la prevención y control de la enfermedad.

### **Agente de la encefalopatía espongiiforme bovina.**

Las encefalopatías espongiiformes constituyen un tipo único de enfermedades degenerativas del cerebro que se transmiten experimentalmente por inoculación o ingestión de materia cerebral u otros tejidos del sistema nervioso central, incluyendo médula espinal, glándulas salivares y tejidos linfoides (bazo y ganglios linfáticos). Los cambios más significativos incluyen degeneración espongiiforme de las neuronas que conduce a su muerte.

La naturaleza del agente de la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) como la de otros procesos semejantes del ganado ovino y caprino (*scrapie* o trembladera) aún no está suficientemente aclarada, aunque informaciones obtenidas en los últimos años apuntan a una proteína diferente de los virus (Prusiner, 1989); además, sus características de termorresistencia que les permite permanecer infecciosos incluso después de varias horas de ebullición a 100°C o después de ser expuestos largo tiempo a irradiación con rayos X, y el hecho de que no induzcan ningún tipo de respuesta inmune, hace pensar en la posibilidad de que pudiera estar implicada etiológicamente una proteína del hospedador modificada postranslacionalmente (Hope *et al.*, 1986). Todos estos agentes producen el cuadro clínico correspondiente después de un largo periodo de incubación, afectando al sistema nervioso central con una histopatología espongiiforme característica en regiones definidas del mismo.

El agente de la EEB es un buen ejemplo de la influencia de los cambios en las fuentes alimentarias sobre la aparición de enfermedades nuevas. En noviembre de 1986, Wells *et al.* (1987) en Weybridge identificaron en el ganado bovino del Reino Unido

esta enfermedad (Encefalopatía Espongiforme Bovina ó enfermedad de las vacas locas); desde entonces, la epidemia ha provocado el sacrificio de mas de 40.000 vacas en Gran Bretaña, habiéndose descrito también en otros países como Irlanda, Francia o Suiza. La enfermedad posee una evolución muy lenta, con un periodo de incubación que puede prolongarse durante varios años. Experimentalmente es transmisible de un animal a otro e incluso a especies distintas mediante la inoculación de material nervioso o linfoide.

Con ocasión de la aparición de los casos clínicos, pudo comprobarse epidemiológicamente que todos los animales afectados habían ingerido algún tipo de alimento que invariablemente incluía harinas de carne y huesos elaborados a partir de despojos de ganado ovino. En el tiempo de aparición de la enfermedad (años 80) habían tenido lugar a nivel mundial un importante incremento del precio de los carburantes, que junto a otros hechos, fueron la causa de que se produjera un cambio en el sistema de procesado y preparación de estas harinas, sustituyéndo el empleo de hexano (un disolvente que se eliminaba después por calentamiento con calor húmedo) por un tratamiento continuo, pero menos intenso, a base de calor. Aunque el proceso garantizaba la inactivación de los virus ordinarios, permitió sin duda la supervivencia de estos agentes, que como hemos señalado, manifiestan una gran resistencia al calor.

Según todos los indicios, el agente de la encefalopatía espongiforme bovina no es otro que la causa del scrapie o trembladera ovina, vehiculado a través de sus despojos al ganado bovino. Se ha sugerido como probable que la cepa del agente adaptada al bovino, se hubiera reciclado en 1984-85 a través de la alimentación, lo que fue la causa de una mayor sensibilidad de los bovinos a la infección y de un incremento en el número de casos. No se descarta sin embargo, otros modos de contaminación, incluyendo el contacto, sobre lo cual se apoya la existencia de algunos casos en los que no se ha podido demostrar ingestión

de harina de carne contaminada; este hecho, por otra parte, es admitido desde hace mas de 50 años en ovinos y caprinos en el caso del scrapie.

Desde 1990, se han descrito varios casos de encefalopatías en gatos (mas de 50 casos ), circunstancia que relanza el debate acerca de la transmisión a otras especies, incluida la humana, aunque por el momento esto último nunca ha podido demostrarse, siendo esta especulación hasta ahora absolutamente teórica. Recientemente Kirkwood y Cunningham (1994) han descrito casos de encefalopatías de este tipo en diversos animales de zoo en cautividad en las Islas Británicas, incluyendo representantes de las familias *Bovidae* y *Felidae*.

Ninguno de estos agentes ha podido ser aislado y cultivado hasta la fecha. Los estudios de patogénesis hacen necesaria la reproducción experimental en animales de laboratorio (pequeños roedores o primates, fundamentalmente) mediante la inoculación de tejido supuestamente contaminado. Una investigación de este tipo, cuantificada mediante la práctica de diluciones del material en estudio, requiere tiempos tan prolongados como 1 año, para conseguir reproducir manifestaciones clínicas que evidencien la enfermedad.

La comprensión de los mecanismos que conducen a las encefalopatías implica factores genéticos. En el ratón, el gen *sync* y el locus *d* del complejo principal de histocompatibilidad (H-2), controlan el periodo de incubación. El gen *sync* es el de la glicoproteína (PrP), a la que cada vez se presta mas atención en relación con la patogénesis.

Otros autores han descrito el *Prn* («*prion gene complex*») situado en el mismo cromosoma que el anterior, en el que el gen *Prn-i* se relaciona con el periodo de incubación y el *Prn-p* codifica la glicoproteína (PrP), a la que también se denomina «proteína del prion».

En el origen infeccioso se han formulado hipótesis para todos los gustos, desde la postura que señala un virus convencional

filamentoso, hasta una proteína autorreplicable, pasando por un análogo de los viroides vegetales, etc. Experimentalmente, el presunto agente se inactiva por los inactivadores proteicos y no por los productos o sustancias que resultan eficaces frente a los ácidos nucleicos. Un tipo de estructuras fibrilares características, observables al microscopio electrónico («*Scrapie Associated Fibrils*»), reaccionan con anticuerpos anti-PrP, lo que ha sustentado la hipótesis de que contienen PrP y que son en realidad virus filamentosos, aunque otros datos apoyan su consideración como productos neuropatológicos relacionado con la multiplicación del agente, pero en ningún caso agente en sí.

La posibilidad de que se trate de una proteína autorreplicable, un prion («*Proteinaceous Infectious Particle*»), capaz de controlar su propia síntesis, análogamente a como sucede con los mecanismos de transcripción inversa de los retrovirus, gana cada día más adeptos. Tal proteína ha sido descrita en dos formas diferentes; la Pr-Pc, representaría un componente anormal del sistema nervioso central, mientras que la PrP-Sc solo se descubre en el sistema nervioso central de los individuos infectados natural o experimentalmente por los agentes de encefalopatías espongiformes.

Sobre esta base se ha formulado una nueva explicación etiológica que atribuye el origen de la enfermedad a una desregulación del metabolismo proteico (Prusiner, 1991). Sería pues la acumulación de una proteína normal del sistema nervioso bajo una isoforma patológica (PrP-Sc), sin modificación de la cantidad o de la calidad de los mRNA que regulan la síntesis, la causa de la enfermedad.

Se ha propuesto por ello el concepto de enfermedad postranscripcional (Stall *et al.*, 1987) y así, este tipo de enfermedades «de virus lentos» no serían estrictamente infecciosas, aunque la razón del desorden proteico, continúa sin esclarecerse. No puede descartarse tampoco la hipótesis según la cual la PrP-Sc podría tratarse de un producto patológico sintetizado por el sistema nervioso central como reacción a la infección virica.

## BIBLIOGRAFIA

- Albert, M.J., Leach, A., Asche, V., Hennessy, J. and J.L. Penner. 1992. Serotype distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized patients with diarrhea in Central Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 30:1, 207-210.
- Anderson, B., Kelly, C., Threlkel, R., and K. Edwards. 1993. Detection of *Rochalimaea henselae* in cat-scratch disease skin test antigens. *J. Infect. Dis.*, 168:1034-1036.
- Anderson, B., Sims, K., Regneri, R., Robinson, L., Schmidt, M.J., Goral, S., Hager, C., and K. Edwards. 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32:4, 942-948.
- Anon. 1992. Extension of the raccoon rabies epizootic- United States, 1992. *Rabies Bull. Europ.*, 16:4, 15-17.
- Anon. 1992. Scratching the surface of the cat scratch disease controversy. *ASM News*, 58:12, 655-856.
- Anon. 1994. Oral vaccine trials for canine rabies. Inform.Circ., *WHO Medit. Zoon. Control Centr.*, 36: 5-6.
- Appel, M.J. (Edit.). *Virus infections of carnivores*. Elsevier Sci., Publ., Amsterdam, 1987.
- Aubert, M. 1994. Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures?. *Vet.Rec.*, 55-59.
- Acha, P. y B. Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica num. 354. Washington. 1977.
- Argüello, J.L., Llanos, A. and L.I. Pérez-Ordoyo. 1988. Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Med. Vet.*, 5:645-650.
- Baer, G.M., Bellini, W.J., and D.B. Fishbein. *Rhabdoviridae* and their replication. In *Virology*. 2nd. ed., B.N.Fields, D.M.Knipe *et al.*, Chapt. 31. Raven Press. Ltd., New York., 1990.
- Baer, G.M., Bellini, W.J., and D.B. Fishbein. Rhabdoviruses. In *Virology*. 2nd. ed., B.N.Fields, D.M.Knipe *et al.*, Chapt., 32. Raven Press. Ltd., New York, 1990.
- Barrett, T.J., Lior, H., Green, J.H., Karkhria, R., Wells, J.G., Bell, B.P., Greene, K.D., Lewis, J. and P.M.Griffin. 1994. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 by using

pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J.Clin.Microbiol.*, 32:12, 3013-3017.

Barrett, T.J., Kaper, J.B., Jerse, A.E., and I.K.Wachsmuth. 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and animals. *J.Infect. Dis.*, 165:979-980.

Bathia, B., Mittal, K.R. and Frey, J. 1991. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.*, 29:147-158.

Baxter, R., 1994. Lyme Disease: the sensible pursuit of answers. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2, 581-582.

Bernabé,A., Gomez, M.A. Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V., Vera, A., Sierra, M.A., 1990-91. Morphopathology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary tuberculosis. *An. Vet. (Murcia)* 6-7:9-20.

Bernabé,A., Gómez, M.A. Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V. Vera, A., Sierra, M.A., 1990-91. Morphopathology of caprine tuberculosis. II. Generalization of tuberculosis. *An. Vet. (Murcia)* 6-7:21-29.

Bishop,D.H.L. Bunyaviridae. In «*Virology*». 2nd ed. B.N.Fields, D.M.Knipe *et al.* (Edit.), Chapt.41. pg.1160-1161. Raven Press Ltd., New York, 1990

Bitzan,M., Richardson,S., Huang,C., Boyd,B., Petric,M. and M.A.Karmali. 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-Like Toxins) from *Escherichia coli* bind to P Blood Group Antigens of human erythrocytes in vitro. *Infec. Immun.*62(8) 3337-3347.

Blanco, M., Fernandez Garayzabal, J.F., Dominguez, L., Briones, V., Vazquez-Boland,J.A., Garcia, J.A., Suarez, G. 1989. A technique for the direct identification of haemolytic pathogenic *Listeria* on selective plating media. *Lett. Appl Microbiol.*, 9:125-128.

Blanco, J.E., Blanco, M., y J. Blanco. 1995. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. *Microbiol. SEM.*, 11, 97-110.

Blaser, M.J., and L.B. Reller. 1981. *Campylobacter* enteritis. *N.Engl.J.Med.* 305:1444-1445.

Blaser, M.J., Taylor, D.N., and R.A. Feldman. 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol. Rev.*, 5:157-176.

- Bloom, B.R. and Ch.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1064.
- Borr, J.D., Ryan, D.A.J., and MacInnes, J.I. 1991. Analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related organisms by DNA-DNA hybridization and restriction endonuclease fingerprinting. *Int.J.Syst. Bacteriol.* 41:121-129.
- Bourhy, H., Kissi, B., Lafon, M., Sacramento, D., and N.Tordo. 1992. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J.Clin. Microbiol.*, 30:9, 2419-2426.
- Breitschwerdt, E.B., Nicholson, W.L., Kiehl, A.R., Steers, Ch., Meuten, D.J., and J.F. Levine., 1994. Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2, 352-357.
- Brun Buisson, Ch. 1994. Gérmenes tan corrientes..... *Mundo Científico*. 149:14, 780-783
- Buchanan, R.L. Patógenos emergentes. Panorama actual. *En Seminario sobre Microbiología de los Alimentos. Minis.Sanidad y Consumo/ ICMSF/Fac. Veterinaria León. Noviembre, 1994*
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwald, E., and J.P. David. 1982. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis?. *Science* 216:1317-1319.
- Byrdm W., and Kadis, S. 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.*, 57:3901-3906.
- Caldwell, D.E. 1994. End of the pure culture era?. *ASM News*, 60:5, 231-232.
- Campbell, R.S.F., 1994. Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infections. *Vet. Bull.*, 64:1, 1-22.
- Carral Llamazares, J.M. 1995. Fauna piscícola, acuicultura y medio ambiente. *En «Jornadas sobre Veterinaria y Medio Ambiente»*. Vol. II. Facultad de Veterinaria. Delegación de Alumnos, León.
- Carter, A.O., Borczyk, A.A., Carlson, J.A., Harvey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A., Drishnan, C., Korn, D.A., and H.Lior. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N.Engl.J.Med.*, 317:1496-1500.
- Cassell, G.H., 1994., New and emerging infections in the face of a funding crisis. *ASM News*, 60:5, 251-254
- Castro, J.M. 1995. Etiología, patogenia y transmisión del síndrome res-

piratorio reproductor del cerdo. *Anaporc*, 142, 14-24

Center for Disease Control/National Institutes of Health. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. U.S. Department of Health and Human Services. HHS Publication No. (CDC) 86-8395. 1984

Center for Disease Control and Prevention. 1993. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morb.Mortal. Weekly Report*. 42:258-263.

Center for Disease Control and Prevention. 1993. Outbreak of acute illness-Southwestern United States. 1993. *Morbidity. Mortal. Weekly Rep.* 42:421-424.

Center for Disease Control and Prevention. 1993. Update: hantavirus disease- United States, 1993. *Morbidity. Mortal. Weekly Rep.* 42:612-614.

Center for Disease Control and Prevention. 1994. Update: hantavirus pulmonary syndrome-United States, 1993. *Morbidity. Mortal. Weekly Rep.* 43:45-48.

Center for Disease Control and Prevention. 1994. Newly identified hantavirus-Florida, 1994. *Morbidity. Mortal. Weekly Rep.* 43:99-105

Center for Disease Control and Prevention. 1994. Addressing emerging infectious diseases threats: a prevention strategy for the United States. U.S., Department of Health and Human Services, Washington, D.C.

Cordovéz, A., Prado, V., Maggi, L., Cordero, J., Martínez, J., Misraji, A., Rios, R., Soza, G., Ojeda, A., and M.M.Levine. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J.Clin.Microbiol.*, 30:8, 2153-2157.

Chang, S.F., Sgro, J.Y. and Parrisch, C.R. 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J. Virol.*, 66: 6858-6867.

Chantal, J. et J.Blancou. Le virus rabique. *Dans Pasteur et la rage*. Informations Techniques des Services Veterinaires. Nos, 92 à 95. Ministère de l'Agriculture. Paris, 1985.

Chanter, N., HJall, G.A., Bland, A.-P., Hayule, A.J., and K.R.Parsons. 1986. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). *Vet. Microbiol.*, 12:241-253.

Chasey, D. 1994. Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 19, 496-499.

- Childs, J.E., Olson, J.G., Wolf, A., Cohen, N., Fakile, Y., Rooney, J.A., Bacellar, F., and Regnery, R.L., 1995. Prevalence of antibodies to *Rochalimaea* species (cat-scratch disease agent) in cats. *Vet. Rec.*, 519-520.
- Damskar, B., and E.J. Buttone. 1985. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. *J.Infect. Dis.*, 151:170-181.
- Davies, J., 1990. Esplendor y decadencia de los antibioticos. *Mundo Científico*, 143:14, 128-138
- De Chenay, A. 1993. Bacterias traicionadas por su huesped. *Mundo Científico*. 13:140, 970-971.
- De Groot, R.J., Andeweg, A.C., Horzinek, M.C., and Spaan, W.J.M., 1988. Sequence analysis of the 3' end of the feline coronavirus FIPV 79-1146 genome: comparison with the genome of porcine coronavirus TGEV reveals large deletions. *Virology*, 167:370-376
- Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T.J., and H. Koprowski., 1988. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rav. Infect.Dis.*, 10:S785-S798.
- Dolan, M. J., Wong, M.T., Regnery, R.L., Jorgensen, J.H., Garcia, M., Peters, J. and D. Drehner. 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* suggesting cat scratch disease. *Ann. Intern. Med.*, 118:331-336.
- Dom, P., and Haesebrouck, F. 1992. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J. Vet. Med.*, B, 39:303-306.
- Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, M., Plana, A., Kennedy, J., McAlisky, S., M. and Rima, B.K., 1990. *Morbillivirus* in dolphins. *Nature* (London) 348:21
- Domingo, M., Liébrana, E., Carrera, J., Vilafranca, M., Casal, J., Aranaz, A., Altimira, J., Vidal, D., Marco, A., Planell, J.M., Mateos, A., y L.Domínguez. 1995. Eficacia comparativa de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de -interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. *Med. Vet.*, 12:5, 307-317.
- Dormont, D., Brugère-Picoux, J., Chatelain, J., Laplanche, J.L., y J.P. Deslys (1992). Las encefalopatías espongiiformes. De la «vaca loca» al

hombre. *Mundo Científico* 125:12, 558-564.

Doyle, M.P., *E.coli* 0157:H7. En Seminario sobre Microbiología de los Alimentos. Minist. Sanidad y Consumo/ICMSF/Fac. Veterinaria. León, Noviembre 1994.

Duchin, J.S., Koster, F.T., Peters, C.J., Simpson, G.I., Tempest, B., Zaki, S.R., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Nikchol, S., Umland, E.T., Moolenaar, R.L., Reef, S.E., Nolte, K.B., Gallaher, M.M., Butler, M.J.C., Brieman, R.F., and the Hantavirus Study Group. 1994. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N.Engl.J.Med.* 330:949-955.

Essex, M., y P.J. Kanki. 1988. Origen del virus del SIDA. *Investigación y Ciencia.* 147:32-40-

Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A. Studdert, M.J., y D.O. White. *Virología Veterinaria.* Traducc. 2ª ed. inglesa. Edit. Acribia. Zaragoza, 1992.

Flamand, J.R.B., Greth, A., Haagsma, J., and F. Griffin. 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of arabian oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. *Vet. Rec.*, 1994, 115-118.

Frey, J., Perrin, J., and J. Nicolet (1989). Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 57:2050-2056

Gallo, R.C. y Montagnier, L. 1988. El SIDA en 1988. *Investigación y Ciencia.* 147:10-19.

Gannon, V.P.J., Rashed, M., King, R.K., and E.J. Golsteyn Thomas. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31:5, 1268-1274.

Garabal Sánchez, J.I., *Escherichia coli* enteropatógenos porcinos: diseño y desarrollo de una vacuna contra la colibacilosis. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria de Lugo. Departamento de Microbiología y Parasitología. 1994.

Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S., Wilson, P.J. 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 60, 892-898.

Gill, J.S., McLean, R.G., Shriner, R.B. and R.C. Johnson. 1994. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals.

*J.Clin.Microbiol.*, 32:2, 444-451.

Gligic, A., Dimkovic, N., Xiao, S.Y., Buckle, G.J., Jovanovic, D., Vlimirovic, D., Stojanovic, R., Obradovic, M., Diglisic, G., Micic, J., Asher, D.M., LeDuc, J.W., Yanagihara, R., and D.C.Gajdusek. 1992. Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J.Infect.Dis.* 166:113-120

Goodger, J., Nolan, A., Russell, W.P., Dalley, D.J., Thorns, C.J., Stuart, F.A., Croston, P., and D.G. Newell., 1994. Serodiagnosis of Mycobacterium bovis infections in badgers: development of an indirect ELISA using a 25 kDa antigen. *Vet. Rec.*, 1994, 82-85

Gómez Mampaso, E., Listeriosis humana: importancia, grupos de riesgo y portadores. En: «Listeria en Alimentos. Conferencia Consenso»-Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 1993, pag. 141-144

González-Scarano, F., and N.Nathanson. Bunyavirus. In «Virology» 2nd.ed., B.N.Fields, D.M.Knipe *et al.*, (Edit.) Chapt.42. pg. 1213-1216-Raven Press Ltd., New York, 1990.

Graves, L.M., Swaminathan, B., Reeves, M.W., Hunter, S.B., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., and A. Schuchat. 1994. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 32:12, 2936-2943.

Griffin, P.M., and R.V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 13:60-98.

Gunzer, F., and H.Karch. 1993. Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology. *J.Clin.Microbiol.*, 31:10, 2660-2610.

Gunning, R.F. and A.J. Proud, 1994. Rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.*, 123.

Gutierrez, C., B., Tascón, R.I., Suárez-Estrada, J., Vazquez-Boland, J.A., y Rodriguez Ferri, E.F. 1990. Prevalencia de la infección producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en poblaciones porcinas de Castilla y León. *Med. Vet.*, 7:411-426.

Gutierrez, C.B., Tascón, R.I., Rodríguez, J.I., González, O.R., Vazquez Boland, J.A., and Rodríguez Ferri, E.F., 1993. Characterization of V factor dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. *Comp. Immun. Microbiol., Infect.*

*Dis.*, 16:123-130

Gutierrez, C.B., Rodriguez, J.I., Tascon, R.I., Costa, L., Riera, P., and Rodriguez Ferri, E.F. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Spain. *Vet. Rec* (en prensa)

Hahn, B., 1990. Biologically-unique, SIV like HIV-2 variants in healthy west african individuals. En M. Girard y L. Valette (Eds). Fifth Cent Gardes Colloquium on Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases. Pasteur-Merieux, Lyon.

Harder, T.C., Klusmeyer, K., Frey, H., R., Orwell, C., and Liess, B. 1993. Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid morbillivirus isolates by kinetic neutralization employing a novel immunoplague assay. *J. Virol. Methods*, 41: 77-92

Hatfull, G.F. 1994. Mycobacteriophage L5: A toolbox for tuberculosis. *ASM News*, 60(5)255-260.

Helbert, M., Robinson, D., Buchanan, D., Hellyer, T., McCarthy, M., Brown, I., Pinching, A.J., and D.M. Mitchell., 1990. Mycobacterial infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Thorax*, 45:45-48.

Hernández Haba, J. *Campylobacter*. En Seminario sobre Microbiología de los Alimentos. Minist. Sanidad y Consumo/ICMSF/Fac. Veterinaria . León, Noviembre 1994.

Hjelle, B., Jenison, S., Torres-Martinez, N., Yamada, T., Nolte, K., Zumwalt, R., McInnes, K., and G. Myers. 1994. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: evolutionary relationship to known hantaviruses. *J. Virol.*, 68:592-596.

Hjelle, B., Chavez-Giles, F., Torres-Martínez, N., Yates, T., Sarisky, J., Webb, J., and M. Ascher. 1994. Genetic identification of a novel hantavirus of the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis*. *J. Virol.*, 69:10, 6751-6754.

Hope, J., Morton, J.D., Farquhar, C.F., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Kimberlin, R.H. 1986. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal sequence as predicted from the normal brain protein (PrP). *EMBO J.*, 5:2591-2597.

Hoskins, J.D., 1993. Coronavirus infections in cats. *Vet. Clin. North*

*Am.Small Anim. Pract.*, 23:1-16

Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, 345:356-359.

Hughes, J.M., and J.R. La Montagne. 1994. The challenges posed by emerging infectious diseases. *ASM News*, 60:5, 248-250.

Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P., and Anderson, P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 56:1880-1889.

Jansen, R., 1994. The RTX toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. PhD. Thesis. Utrech. The Netherlands.

Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E.M., Gielkens, A.L.J. and M.A.Smits. 1995. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. *FEMS Microb. Lett.*, 126:139-144

Jackson, K., Sievers, A., Ross, B.C., and B.Dwyer. 1992. Isolation of a fastidious Mycobacterium species from two AIDS patients. *J.Clin.Microbiol.*, 30:11, 2934-2937.

Jenison,S., Yamada,T., Morris, C., Anderson,B., Torres-Martinez, N., Keller,N., and B.Hjelle. 1994. Characterization of human antibody responses to four corners hantavirus infections among patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome. *J. Virol.*, 68:5, 3000-3006.

Jobe, D.A., Callister, S.M., Lim, L.C.L., Lovrich, S.D., and R.F. Schell., 1994. Ability of canine Lyme disease vaccine to protect hamsters against infection with several isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.*, 32:3, 618-622.

Johnson,B.K., Ocheng,D. Oogo, S. *et al.* 1986. Seasonal variation in antibodies against Ebola virus in Kenya fever patients. *Lancet* 1:1160.

Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G., and D.J. Brenner. 1984. *Borrelia burgdorferi*: etiologic agent of Lyme disease. *Int.J.Syst. Bacteriol.* 34:496-497.

Joli, R.A.V., Mulks, M.H., and B.J. Thacker. 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 38:329-349.

Junta de Castilla y León. Consejería de Cultura y Bienestar Social. Guia para la prevención y diagnóstico de la Tuberculosis. Valladolid, 1988.

Kappeler, A., 1989. Bat rabies surveillance in Europe. *Rabies Bull.*

- Europ.*, 13:4, 12-13.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N.H., Ostroff, S.M., and J.Lassen. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in Southeastern Norway. *J.Clin. Microbiol.*, 30:12, 3117-3121.
- Karmali, M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2:15-38.
- King, A., Davies, P., and A. Lawrie. 1990. The rabies viruses of bats. *Vet. Microbiol.*, 23:165-174.
- Kirkwood, J.K., y Cunningham, A.A., 1994. Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec.*, 135, 296-303
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. (Edit.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- Kubica, G.P., and Wayne, G. (Edit.). *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Parts A and B. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1984
- La Posta, V.J., Auperin, D.D. Kamin-Lewis, R., and G.A. Cole. 1993. Cross-protection by a CD4+ T-cell clone specific for an envelope glycoprotein epitope of Lassa virus. *J.Virol.*, 67:6, 3497-3506
- Landesman, L. 1994. Negative impacts of coastal aquaculture development. *World Aquaculture*, 25 (2) 12-17
- Lallier, R., Leblanc, L., Morrissette, F., and Higgins, R. 1987. Detection of a permeability factor produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr. Microbiol.*, 15:141-144.
- Lederberg, J., *et al.* (Edit.) 1992. *Emerging infections: microbial threats to health in the United States*. National Academy Press, Washington, D.C.,
- Lederberg, J. 1994. Emerging infections: private concerns and public responses. *ASM News*, 60:5, 233-
- Lee, H. W., and P.W. Lee. 1976. Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J.Intern. Med.* 19:371-383.
- Lee, P.W., Amyx, H.L., Gajdusek, D.C., Yanigihara, R., Goldgaber, D. and C.J.Bibbs, Jr., 1982. New haemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in indigenous wild rodents in United States. *Lancet* ii:1405
- Lee, H.W., Lee, P.W., Baek, L.J., and Y.K.Chu. 1990. Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses.

*Arch. Virol. Supp.* 1:5-18.

Le Guenno, B. 1995. Los nuevos virus. *Investig. Cienc.*, jul. 44-51

Lerman, Y., Cohen, D., Gluckj, An., Ohad, E., and I. Sechter. 1992. A cluster of cases of *Escherichia coli* 057 infection in a day-care center in a communal settlement (Kibbutz) in Israel. *J. Clin. Microbiol.*, 30:2, 520-521.-

Liegner, K.B., 1993. Lyme disease: the sensible pursuit of answers. *J. Clin. Microbiol.*, 31:8, 1961-1963.

Loirat, C., Sonsinbo, E., Varga Moreno, A., Pillion, G., Mercier, J.C., Beaufile, F., and Mathieu, H. 1984. Hemolytic-uremic syndrome: an analysis of the natural history and prognostic features. *Acta Paediatr. Scand.*, 73:505-514.

Mainil, J.g., Duchesnes, C.J., Whipp, S.C., Marques, L.R., O'Brien, A.D., Casey, T.A. and H.W.Moon. 1987. Shiga-like toxin production and attaching and effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 48:743-748.

Magnarelli, L.A., Oliver, J.H., Hutcheson, H.J., Boone, J.L., and J.F. Anderson. 1992. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in rodents in the Eastern and Southern United States. *J. Clin. Microbiol.*, 30:6, 1449-1452.

Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., and K.C. Stafford III. 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine of *Peromyscus leucopus* by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 32:3, 777-782.

Mateos Sagredo, D., Efecto de factores ambientales en la expresión *in vivo e in vitro* de caracteres de virulencia de *Aeromonas hydrophila*. Tesis Doctoral. Universidad de León. 1995.

Mattews, P.R.J., and Pattison, I.H. 1961. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *J. Comp. Pathol.*, 71:44-52.

Mekalanos, J.J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.*, 174:1, 1-7

Ministerio de Sanidad y Consumo. Conferencia Consenso. Listeria en Alimentos. Madrid, 1993.

Moller, K., Nielsen, R., Andersen, L.V., and M. Kilian. 1992. Clonal analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* population in a geographically restricted area by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 30:3, 623-627.

- Montañó Hirose, J., Bourhy, H., and M.Lafon. 1990. A reduced panel of anti-nucleocapsid monoclonal antibodies for bat rabies viruses identification in Europe. *Res. Virol.*, 141:571-581.
- Montenegro, M.A., Bülte, M., Trumpf, t., Aleksié, S., Reuter, G., Bulling, R., and R.Helmuth. 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J.Clin. Microbiol.*, 28:1417-1421.
- Morisse, J.P., 1988. Le syndrome «septicémie hémorragique» chez le lappin: premières observations en France. *Le Point Vet.*, 20:79-83.
- Müller, W. W., 1990. Report on seminar of wildlife rabies control. Part-1 and Part-2. *Rabies Bull. Europe*, 3 and 4/1990 pg. 11-14 and 13-17.
- Müller, W.W., 1993. Development of animal rabies in the United States of America 1955 to 1992. *Bull.Rab. Europe*, 17:3, 16
- Murphy, F.A., Kiley, M.P., and S.P.Hoch. Marburg and Ebola viruses. In «Virology», 2nd ed., B.N.Fields, D.M.Knipe *et al.*, (Edit.) Chapt. 33 pg, 933-942. Raven Press Ltd., New York, 1990.
- Murray, K., Selleck, P., Hooper, P. Hyat, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., Rodwell, B., and Ketterer, P., 1995. A *Morbillivirus* that caused fatal disease in horses and humans. *Science*, 268:94-97.
- Musser, J.M., Rapp, V.J., and R.K. Selander, 1987. Clonal diversity in *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 55:5, 1207-1215.
- Mustonen, J., Brummer-Korvenkijontio, M., Hedman, K., Pasternack, A., Pietila, K., and A. Vaheri. 1994. Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. *Scand. J.Infect. Dis.*, 26:7-13.
- Nathanson, N., Mc Gann, K.A., Wilesmith, J., Desrosiers, R.C., and Brookmeyer, R., 1993. The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity and control. *Virus Res.*, 29:3-20.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., Garcia, C., de la Garza, M. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrad porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can.J. Vet. Res.*, 58, 83-86.
- Nicolette, J., 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Leman, A.D., Straw, B., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J., (eds). Diseases of swine. Ames, Iowa State University Press, 401-408.
- Nichol, S.t., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Child, J., Zaki, S. and C.J. Peters. 1993.

Genetic identification of a novel hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern United States. *Science* 262:914-917.

Nielsen, R., 1986. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. *Acta Vet. Scand.*, 27:49-58.

Nightingale, S.D., Byrd, L.T., Soutyhern, P.M., Jockusch, J.D., Cal, S.X. and b.A. Wynne. 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus positive patients. *J.Infect. Dis.*, 165:1082-1085.

Novoa, C., Pickering, X., Sanchez, B., Garcia, P., Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., y L.Domínguez. 1995. La tuberculosis felina: un riesgo para la salud humana y animal. Etiología, lesiones y diagnóstico. *Med. Vet.*, 12:5, 279-284.

O'Brien, A.D., Melton, A.R., Schmitt, C.K., McKee, M.L., Batts, M.L., and D.E. Griffin. 1993. Profile of *Escherichia coli* 0157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *J.Clin. Microbiol.*, 31:10, 2799-2801.

Olsen, C.W. 1993. A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet. Microbiol.*, 36:1-37

Orskov, R., Orskov, I., and J.A. Villar. 1987. Cattle as a reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* ii:276.

Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M. and J.H.Lewis. 1989. Infections with *Escherichia coli* 0157:H7 in Washington State. *JAMA*. 262: 355-359.

Otero, J.A., 1994. Borreliosis de Lyme. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

Padula, S.J., Dias, F., Sampieri, A., FGraven, R.,B., and R.W. Ryan. 1994. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32:7, 1733-1738.

Pagés Manté, A. 1989. Aspectos epidemiológicos y laboratoriales de la enfermedad hemorrágica del conejo (R.H.D.) en España. *Med. Vet.*, 6:153-158.

Paradis, S.E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., Jacques, M., 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* biotype 2 (Berschinger 2008/76). *Int. J.Syst. Bacteriol.*, 27:319-320.
- Park, J.H., Ochiai, K. and C. Itakura. 1993. Aetiology of rabbit haemorrhagic disease in China. *Vet. Rec.*, 133, 67-69.
- Parra, F., and M.Prieto. 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.*, 64:8, 4013-4015.
- Parrish, C.R., 1990. Emergence, natural history and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Adv. Virus Res.*, 38:403-450.
- Parrish, C.R., 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology*, 183:195-205.
- Parrish, C.R., 1993. Canine parvovirus 2: A probable example of interspecies transfer. In S.S. Morse (ed.) *Emerging Viruses*, Oxford University Press Inc., Oxford, pp. 194-202.
- Pedersen, N.C., Boyle, J.F and Floyd, K., 1981. Infection studies in kittens using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am.J.Vet.Res.*, 42:363-367.
- Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K., 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-syndrome. *Science*, 235:790-793.
- Pensaert, M.B.(Edit.) *Virus infections of porcines*. Elsevier Sci.Publ., Amsterdam, 1989.
- Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.R., Beynon, L.M., and Richards, J.C. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.*, 4:299-308.
- Peters, C.J. 1994. Molecular Techniques identify a new strain of Hantavirus. *ASM News*, 60:5, 242-243.
- Plana Durán, J.M., Vayreda Casadevall, M., Bastons Prat, M., and X Vilá Molas. 1989. Calicivirus: firme candidato como agente inductor de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo. *Med. Vet.*, 6:87-88.
- Plyusnin, A., Vapalahti, OI, Lankinen, H., Lehvaslaiho, H., Apekin, N., Myasnikov, Y., Kallio-Kokko, H., Henttonen, H., Lundkvist, A., Brumer-Korvenkontio, M., Gavriolovskaya, I. and A. Vaheri. 1994. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by european common voles. *J. Virol.*,

68:12, 7833-7839

Pitt, J.L. Micotoxinas. *En Seminario sobre Microbiología de Alimentos*. Ministerio de Sanidad y Consumo-ICMSF-Facultad de Veterinaria de León. Nov. 1994.

Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., and Mannheim, W., 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 33:5, 510-514-

Prescott, J.F., and D.L. Munroed. 1982. *Campylobacter jejuni* enteritis in man and domestic animals. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 181:1524-1530.

Prusiner, S.B., 1991. Molecular biology of prion diseases *Science*, 252, 1515-1522

Prusiner, S.B. 1995. El prion en la patología. *Invest.Cienc.*, marzo, 14-21

Queralt, G., Audoly, G., sonigo, P., and Vigne, R. 1990. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentivirus. *Virology*, 175: 434-447.

Quevedo, F., Michaine, S., y S. González Ayala (Edits.). Actualización de enfermedades transmitidas por alimentos. OPS/OMS, 1990.

Ralovich, B.S. 1987. Epidemiology and significance of listeriosis in the european countries. Listeriosis. Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control. Compiled by A. Schönberg. Berlin (West), Dec. 1986. pp. 21-55

Rapp, V.J., Munson, R.S., and Ross, R.F., 1986. Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 52:414-420.

Rasiah, Ch., Rauer, S., Gassmann, G.S., and A. Vogt. 1994. Use of a hybrid protein consisting of the variable region of the *Borrelia burgdorferi* flagellin and part of the 83 kDa protein as antigen for serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32:4, 1011-1017.

Ratledge, C., Stanford, J. and J.M. Grange (Edit.). the Biology of the *Mycobacteria*. Vol. 3. Academic Press, London, 1989.

Regnery, R.L., Olson, J.G., Perkins, B.A., and W. Bibb. 1992. Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scrach disease. *Lancet* 339:1443-1445.

Remis, R.S., MacDonald, K.L., Riley, L.W., Puhr, N.D., Wells, J.G., Davis,

- B.R., Blake, P.A., and M.L.Cohen. 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* 0157:H7. *Ann.Intern.Med.* 101:624-662.
- Rigby, M.A., Holmes, M., Pistello, Mackay, A., Leigh Brown, A.J., and Neil, J.c., 1993. Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus: molecular epidemiology and evidence of selection for change. *J.Gen. Virol.*, 74:425-436.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L. M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., and M.L.Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N.Engl. J.Med.*, 308:6881-6885.
- Rocourt, J., 1990. *Listeria* et listeriose humaine. *Annales de L'Institut Pasteur/Actualités.* 1:25-30
- Rodríguez Barbosa, J.I., Gutiérrez, C.B., Tascón, R.I., Suárez, J., De Noronha, F., and E.F. Rodríguez Ferri. 1995. Characterization of monoclonal antibodies to O-antigen of lipopolysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and their use in the classification of field isolates. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, 11:35-44.
- Rodríguez Barbosa, J.I., et al., 1995. Evidence of monoclonal antibodies that O-antigen is the major antigen responsible for the cross-reactivities between serotypes 4 and 7 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Clin. Diagn.Lab. Immunol.* (en prensa)
- Rodríguez Barbosa, J.I., Mittal, K., Gutiérrez, C.B., González, O.R., Tascón, R.I., and Rodríguez Ferri, E.F. 1995. Characterization of a set monoclonal antibodies that specifically recognize epitopes located on O-antigen of lipopolysaccharide shared among serotypes 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pendiente de publicación)
- Rodríguez Ferri, E.F. Estado actual de la rabia animal, con especial referencia a España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 3ª edic., 1987.
- Rodríguez Ferri, E.F. 1993. El problema de la listeriosis. *En Listeria en alimentos.* Conferencia Consenso. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- Rodríguez Ferri, E.F. 1995. Zoonosis microbianas. Avances recientes. *En I Congreso de Veterinarios de Castilla y León.* USCAL. León.
- Rosendal, S., and MacInnes, J.I. 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am.J.Vet.Res.*,

51:711-717

- Rycroft, A.N. and Cullen, J.M. 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am.J.Vet.Res.*, 51:1449-1453.
- Satcher, D. and A.S. Fauci. 1994. Two views on the problem of emerging infectious diseases. *ASM News*, 60:5, 234-235.
- Schneider, L.G., 1982. Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 5:101-107.
- Schoonderwoerd, M., Clarke, R.C., van Dreumel, T.A. and S.A. Rawluk., 1988. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strains of *Escherichia coli* 0111:NM. *Can. J. Vet. Res.* 54:484-487.
- Seifert, H.S., and So, M., 1988. Genetic mechanisms of bacterial antigenic variation. *Microbiol. Rev.*, 52:3, 327-333.
- Sherwood, D., Snodgrass, D., and A.D. O'Brien. 1985. Shiga-like toxin production from *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Vet. Rec.*, 116:217-218.
- Shoberg, R.J., Jonsson, M., Sadziene, A., Bergstrom, S., and D.D. Thomas. 1994. Identification of a highly cross-reactive outer surface protein B epitope among diverse geographic isolates of *Borrelia* spp. causing Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2, 489-500.
- Siegl, G., 1984. Canine parvovirus: origin and significance of a «new» pathogen. In K.I. Berns (ed.). *The Parvoviruses*. Plenum Press. New York., USA, pp. 363-388.
- Slutsky, A.M., Arbneit, R.D., Barber, T.W., Rich, J., Fordham, C., Pieciak, W., Barlow, M.A., and J.N. Maslow. 1994. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 32:7, 1773-1778.
- Smith, C.E.G., Simpson, D.I.H. and Bowen, E.T.W. 1967. Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet*, 2:1119-1121.
- Soolingen, D. van, Haas, P.E. de., Haagasma, J., Eger, T., Hermans, P.W.M., Ritacco, V., Alito, A., and J.D.A. van Embden. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 32:10, 2425-2433.
- Snijder, E.J. and Horzinek, M.C. 1993. Toroviruses: replication, evolution

and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J. Gen. Virol.*, 74:2305-2316.

Spencer, J.A., Van Dijk, A.A., Horzinek, M.C., Egberink, H.F., Bengis, R.G., Keet, D.F., Morikawa, S., and Bioshop, D.H.L., 1992. Incidence of feline immunodeficiency virus reactive antibodies in free-ranging lions of the kruger National Park and the Etosha National park in Southern Africa detected by recombinant FIV p24 antigen. *Ondersteport J. Vet. Res.*, 59:315-322.

Stacey, A.R., 1986. Isolation of Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum complex from faeces of patients with AIDS. *Br. Med. J.*, 293:1194.

Stewart, P.J., Desormeaux, W., and J.Chene. 1983. Hemorrhagic colitis in a home for the aged: Ontario. *Can. Dis Weekly Rep.*, 9:29-32

Strauch, D. (Edit). Animal production and environmental health. World Animal Science. B6. Elsevier Science Publ., B.V. Amsterdam, 1987.

Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y. and Parrisch, C.R. 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*, 198:175-184.

Strauss, E.G., Strauss, J.H. and A.J. Levine. Virus Evolution. In «Virology». 2nd ed., B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* (Edit.). Raven Press, Ltd, New York, 1990 pg. 167-188

Suárez Fernández, G., Retrovirus animales y salud pública. Discurso para la recepción en la Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, 1993.

Szathmary, E., and J.M. Smith. 1995. The major evolutionary transitions. *Nature*, 374:227-232

Tascón, R.I., Rodríguez Ferri, E.F., Gutiérrez, C.B., Rodríguez Barbosa, J.I., Berche, P., and J.A. Vázquez Boland. 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.*, 175:17, 5717-5722.

Tascón, R.I., Vázquez Boland, J.A., Gutiérrez, C.B., Rodríguez Barbosa, J.I., and E.F. Rodríguez Ferri. 1994. The RTX haemolysins Apx I and Apx II are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.*, 14(2), 207-216.

Thoresen, O.F., and Saxegaard, F. 1991. Gen-Probe rapid diagnostic

- system for the *Mycobacterium avium* complex does not distinguish between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Clin. Microbiol.*, 29:10, 2360-2361
- Tjomb, P., 1993. *Listeria*: la mise en cause de Kermené confirmée. *RIA*. 506, 52-53
- Truyen, U., Agbandje, M. and Parrish, C.R., 1994. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology*. 200:494-503.
- Truyen, U., Parrish, C.R., Harder, T.C., and Kaaden, O.R. (1995). There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. *Vet. Microbiol.*, 43, 103-122.
- Udeze, F.A., Latimer, K.S. and Kadis, S. 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am.J.Vet.Res.*, 48:768-773.
- Van de Bosch, J.F., Jongenelen, I.M.C.A., Puiben, N.B., Van Vugt, F.C.A., Segers, R.P.A.M. 1992. Protection induced by a trivalent *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. Proc. 12th Intern. Pig Vet. Soc., Congress, The Hague, The Netherlands, 194.
- Vazquez Boland, J.A., Dominguez, L., Rodriguez Ferri, E.F., Fernández Garayzabal, J.F. and G. Suárez. 1989. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 65:95-100
- Visser, I.K.G., Kumarev, V.P., Orvell, C., De Vries, P., Broeders, H.W.J., van de Bildt, M., Green, J., Teppema, J.S., Burger, M.C., Uydehaag, F.G.C.M. and Osterhaus, A.D.M.E., 1990. Comparison of two morbillivirus isolated from seals during the outbreak of fustemper in north western Europe and Siberia. *Arch.Virol.*, 111:149-164.
- Weiss, R., 1992. On the track of «killer» TB. *Science*, 255:148-150.
- Welch, R.A., 1991. Pore-forming cytolysins of Gram negative bacteria. *Mol.Microbiol.*, 5:521-528.
- Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R., and G.K.Molrris. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J.Clin.Microbiol.*, 18:512-520.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.J., Gunning, r.F., Hancock, R.D. Jeffrey, M., Dawson, M. and R. Bradley. 1987. A novel progressive

spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*121:419-420

Wells, J.G., Shipman, L.D., Greene, K.D., Sowers, E.G., Green, J.H., Cameron, D.C., Downes, F.P., Martin, M.L., Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Potter, M.E., Tauxe, R.V., and L.K. Wachsmuth. 1991. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. *J.Clin.Microbiol.*, 29:985-989.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51:2m 221-271.

WHO. WHO expert committee on rabies. WHO technical report series. Eighth Report., núm. 824. Geneva, 1992.

W.H.O. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). Geneva, 1993.

Xing, Z., and J.L. Whitton. 1993. An anti-lymphocytic choriomeningitis virus ribozyme expressed in tissue culture cells diminishes viral RNA levels and leads to a reduction in infectious virus yield. *J. Virol.*, 67:1840-1847

Yakrus, M.A., and R.C. Good. 1990. Geographic distribution, frequency and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J.Clin.Microbiol.*, 28:926-929.

Yakrus, M.A., Reeves, M.W., and S.B. Hunter. 1992. Characterization of isolates of *Mycobacterium avium* serotypes 4 and 8 from patients with AIDS by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 30:6, 1474-1478.

Zbinden, R., Goldenberger, D., Marinetti Lucchigini, G., and M. Altwegg. 1994. Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.*, 32:7, 1795-1798.

Zhang, Y.S. and Tanimoto, T. (1992). Ridges, hotspots and their interactions as observed in seismic velocity maps. *Nature* 335:45-49

Zychilinsky, A., Kenny, B., Menard, R., Prévost, M.-C., Holland, I.B., and Sansonetti, P. 1994. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, 11: 619-627.

# DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL EXCMO. SR. D. GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ

*EXCMO. SR. PRESIDENTE*

*EXCMOS. E ILUSTRÍSIMOS SEÑORES ACADÉMICOS  
SEÑORAS Y SEÑORES:*

Tengo el honor, en nombre de la Real Academia de Doctores, de dar la bienvenida al nuevo Académico de Número D. Elias Fernando Rodríguez Ferri, elegido para ocupar el sillón número 90, adscrito a la Sección 10<sup>a</sup> correspondiente a la Especialidad de Ciencias Veterinarias.

Es este siempre un honroso cometido, especialmente grato y entrañable en este caso, ya que el discurso de recepción se refiere a un discípulo, colega y amigo, de brillante ejecutoria científica, docente y académica de la que, quiso la fortuna, que fuésemos un testigo de excepción.

El Prof. Rodríguez Ferri nace en Caparros (Navarra) a finales de la década de los 40, hijo de Virgilio y Consuelo, leonés él y valenciana ella, y en León habrían de transcurrir su niñez y juventud. De su padre hereda un especial amor al trabajo y de su madre la medida y tolerancia, de ambos la rectitud y la hombría de bien.

En León estudia el Bachillerato en el Colegio Leonés, en donde compagina las tareas docentes con el deporte, llegando a ser un destacado jugador de Hockey en sala y hierba, al tiempo que un excelente alumno.

Finalizada la enseñanza secundaria, inicia en el curso 1966-67 los estudios correspondientes a la licenciatura en Veterinaria, que concluye con gran brillantez en julio de 1971, obteniendo el Premio Extraordinario de Licenciatura.

Especial recuerdo nos merece su calidad de alumno excepcional en las disciplinas de Microbiología e Inmunología y de Virología, de las que eramos Profesor, su desembarco en el Departamento de Microbiología e Inmunología, dirigido por el insigne Profesor D. Santos Ovejero del Agua, y movido ya por una clara vocación, la realización de su Tesis Doctoral, bajo nuestra dirección, seguida en parte en la Facultad de Farmacia de Barcelona, su llegada a la Facultad de Veterinaria de Madrid en 1978 como Profesor Adjunto, que ya lo era en la Facultad de León, adscrito al Departamento de Microbiología, en cuya situación permaneció por espacio de seis años, al cabo de los cuales obtiene por Concurso-Oposición, de forma brillante, la plaza de Profesor Agregado Numerario en el propio Departamento, alcanzando a renglón seguido el título de Catedrático de Universidad.

En el curso 1986-87 gana de nuevo por Concurso-Oposición y con todo mérito, la Cátedra de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de León, su tierra y la nuestra, en cuyo destino continúa. Desde 1990 es Decano de dicho Centro, en el que ha realizado importantes mejoras de infraestructura y organización. Bajo su mandato, se ha incorporado a la Facultad de Veterinaria la nueva titulación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

La relación de sus méritos es muy extensa e importante, máxime si se valora en relación con su edad y, por su trayectoria y juventud, no resulta aventurado pronosticar un futuro de esplendor tanto en la docencia como en la investigación y gestión universitarias.

En aras de la brevedad vamos a referir aquellos mas sobresalientes a nuestro juicio.

Es Diplomado en Sanidad. En la Escuela Nacional de Sanidad ha seguido diversos estudios de Epidemiología y Zoonosis, como alumno primero y profesor después.

En 1975 ingresó por oposición en el Cuerpo Nacional Veterinario, hallándose en la actualidad en situación de excedencia.

Ha pasado por todos los niveles en materia académica, desde Colaborador Honorífico a Profesor Adjunto, Profesor Agregado y Catedrático de Microbiología e Inmunología, por espacio de 24 años de manera ininterrumpida. Por breves periodos de tiempo y requerido para ello, ha simultáneado las tareas docentes con responsabilidades en las Areas de Sanidad Animal (Ministerio de Agricultura) y Zoonosis (Ministerio de Sanidad y Consumo), lo que ha contribuido a su amplia formación sanitaria.

Ha desempeñado el cargo de Secretario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense y de la propia Facultad entre 1983 y 1986.

Investigador principal en cuatro proyectos subvencionados por el Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico y en otros cuatro patrocinados por la Junta de Castilla y León y Empresas Privadas, ha participado además como Investigador colaborador en otros proyectos, cultivando a lo largo de los años áreas de trabajo en Microbiología de los Alimentos, Zoonosis, así como en estudios relacionados con la etiología, el diagnóstico microbiológico e inmunológico y la prevención y control de diversas enfermedades microbianas de los animales.

Cuenta en su haber con mas de 70 publicaciones, la mayoría en revistas de elevado nivel científico, nacionales e internacio-

nales. Otras tantas comunicaciones y ponencias constituyen su participación en Congresos, Reuniones y Simposios nacionales e internacionales. Es autor de cinco monografías patrocinadas por el Ministerio de Sanidad y Consumo sobre temas microbiológicos, epidemiológicos, de sanidad ambiental y alimentaria.

Ha sido presidente de la Conferencia Consenso sobre Listeria en Alimentos, celebrada en la Facultad de Veterinaria de León en 1992, a instancias del Ministerio de Sanidad y Consumo. Igualmente, organizó y participó activamente en el Seminario que la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) impartió en el mismo lugar en noviembre de 1994.

Entre las distinciones con que cuenta destaca la Encomienda de la Orden Civil del Mérito Agrícola.

Pero no se trata de abrumarles con su preciado historial, porque queda ya bien claro con esta sucinta exposición, el nivel de mérito que atesora el Prof. Rodríguez Ferri en los campos microbiológico y sanitario, que ha sabido cultivar con tanto éxito como ejemplar dedicación.

El tema elegido para su discurso no puede ser mas actual y oportuno, siendo como ha sido, tratado de forma magistral.

El propio título es muy preciso y acorde con la línea conceptual en uso.

Constantemente se identifican nuevos virus y microbios en general. Las alteraciones ambientales, de carácter natural o artificial, favorecen la presentación y propagación de estos agentes, capaces de originar temibles epidemias cuando se incrementa su virulencia.

Sin minusvalorar el interés de las emergentes acciones bacterianas por *Borrelia burgdorferi* en la enfermedad de Lyme,

de *Listeria monocytogenes*, de *Escherichia coli* enterohemorrágico o de *Mycobacterium tuberculosis*, es en el ámbito de las enfermedades víricas en donde el problema de nuevas patologías de carácter infeccioso, cobra el mas elevado interés.

Dejando a un lado el grave y complejo problema del SIDA, en el que comienzan a verse atisbos de solución, quizá a medio plazo, y que justificaría por si solo el postulado anterior, es en el área de las virosis en donde mas frecuentemente se presentan esos cambios bruscos de comportamiento patogénico, seguido, en ocasiones, de adaptación a una nueva especie, brotando así un problema infeccioso que hemos dado en llamar emergente.

En el IV Congreso Nacional de Virología, que nos honramos en organizar, celebrado en Madrid en el pasado mes de setiembre, una de las tres sesiones plenarias llevaba por título «*Nuevos virus, nuevas enfermedades*», destacándose, por su rabiosa actualidad el tema de los virus de las fiebres hemorrágicas, Ebola, Marburgo, Hantaan y Lassa, entre otros.

En realidad los virus no son «*nuevos*» puesto que ningún virus puede aparecer repentinamente, aunque si pueda ocurrir que la producción de mutaciones o de recombinación entre virus existentes sea el origen de cepas más virulentas.

Los «*nuevos*» virus se manifiestan, a veces con patologías fulminantes, porque se modifican las condiciones en que existían desde hacía años, quizá en un reservorio ignorado, animal vertebrado o artrópodo. Un cambio ambiental que afecte a este equilibrio ecológico silente entre virus y vector, puede favorecer la multiplicación y propagación del agente, induciendo así la aparición de nuevas enfermedades.

En otras palabras, para que se contagie el ser humano, o una nueva especie animal, es preciso que el ciclo biológico de estos virus sufra una perturbación.

La posible llegada de virus a la tierra, procedentes del espacio exterior, tal y como han supuesto diversos autores y últimamente el astrofísico inglés Fred Hoyle, no puede admitirse a la luz del conocimiento biológico actual. Los virus necesitan de células vivas para su crecimiento y multiplicación, y no se ha podido demostrar la presencia de vida en otros planetas, mas o menos próximos al nuestro.

En diferente orden de ideas, la pandemia debida al virus productor del SIDA reveló dos hechos importantes desde el punto de vista epidemiológico, uno conceptual, demostrando el interés capital de la inmunología microbiana, preterida en la década de los 80 frente a temas de autoinmunidad, histocompatibilidad o rechazo, el otro descubriéndonos la gran amenaza de las enfermedades «*emergentes*».

Fruto de esta advertencia ha sido la creación de una red internacional de vigilancia para seguir la pista tanto a los agentes infecciosos de nueva aparición, sean virus, bacteria, hongos o parásitos, como a los que reaparecen con renovada virulencia, para originar epidemias de peste, cólera o tuberculosis, pongamos por ejemplo.

Entre los «nuevos» agentes, los virus de las fiebres hemorrágicas ocupan un lugar preeminente, y los aparecidos en el curso de los cinco últimos años pertenecen únicamente a tres familias: *Arenaviridae*, *Bunyaviridae* y *Filoviridae*. Todas tienen en común un «core» de ARN monocatenario negativo, por lo que el mensaje contenido en su genoma está constituido por ribonucleótidos en lugar de desoxirribonucleótidos, como sucede en los seres vivos en los que la información parte del ADN.

La familia *Filoviridae* en la que figuran los virus productores de las enfermedades de Ebola o Marburgo, destaca por su gran actualidad epidemiológica y también por la extraña morfología y

estructura de los filovirus, que se asemejan por su enorme longitud a un cabello. Esta longitud puede llegar y sobrepasar incluso los 1.500 nanómetros, unas diez veces el tamaño de un virus normal, siendo su grosor, en cambio de tan solo 75 a 100 nanómetros.

Hay muchos aspectos en torno a la biología de este grupo de virus, que se desconocen por el momento y otros, mejor conocidos, que han sido magníficamente expuestos en el discurso que acabais de oír.

Con su magnífica intervención el Profesor Rodríguez Ferrinos ha demostrado un amplio y profundo conocimiento de un tema sanitario tan actual y significativo como es el de los microorganismos patógenos emergentes, uno de los mas importantes sin duda en la epidemiología humana y animal.

La Real Academia de Doctores se felicita hoy al poder incluir en su nómina a una prestigiosa figura de las Ciencias Veterinarias y, en su nombre, nos ha correspondido la grata misión de darle la bienvenida a esta Corporación.

## INDICE

Microorganismos patógenos de nueva identificación o de interés creciente (patógenos emergentes) en los animales. Zoonosis .....	3
Introducción.....	5
Factores relacionados con la emergencia .....	9
1. Cambios sociales y en el comportamiento .....	10
Crecimiento de la población, densidad y distribución .....	10
Inmunosupresión de la población .....	12
2. Tecnología e Industria .....	13
Producción y recogida de los alimentos .....	14
El uso de antibióticos en la alimentación animal.....	15
Cambios en la tecnología del procesado de los alimentos.....	16
Cambios en el tamaño de la industria alimentaria .....	16
3. Infecciones nosocomiales.....	17
4. Viajes y comercio internacionales .....	18
5. Evolución y adaptación microbiana.....	19
Variación natural y mutación .....	19
Adaptaciones y cambios microbianos motivados por la presión selectiva. Desarrollo de resistencias .....	27
Presión inmunológica .....	29
6. Ruptura de las medidas y controles de salud pública .....	29
Identificación. Lucha y control .....	30
Patógenos emergentes y zoonosis .....	33
I. Bacterias	
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 .....	33
<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> .....	40

<i>Listeria monocytogenes</i> .....	41
<i>Aeromonas hydrophila</i> .....	48
<i>Borrelia burgdorferi</i> . Enfermedad de Lyme .....	51
Rickettsias. <i>Rochalimaea henselae</i> .....	54
Micobacterias. Tuberculosis .....	56
II. Virus	
<i>Morbillivirus</i> equino .....	65
Virus rábico .....	67
Virus de Marburgo y Ebola .....	78
Hantavirus .....	82
Arenavirus.....	85
Patógenos nuevos o de interés creciente de los animales, cuya transmisión al hombre no ha sido demostrada .....	87
I. Bacterias	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . Pleuroneumonía porcina ..	87
II. Virus	
<i>Parvovirus</i> felino .....	95
Virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino .....	98
<i>Coronavirus</i> felinos .....	100
<i>Morbillivirus</i> .del moquillo de los delfines y de las focas.....	101
<i>Lentivirus</i> felinos y de simios .....	103
Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo .....	109
Agente de la encefalopatía espongiiforme bovina .....	110
Bibliografía .....	114
Discurso de contestación del	
Excmo. Sr. D. Guillermo Suárez Fernández .....	105

<sup>1</sup>GATT: Acuerdo General sobre Aranceles Aduaneros y Comercio

<sup>2</sup>NIH: National Institute Health

<sup>3</sup>CDC: Center for Disease Control and Prevention

<sup>4</sup>ICMSF: International Microbiological Specifications for Foods

<sup>5</sup>ERA: Evelyn Rokitniki Abelseth

<sup>6</sup>CVS: Challenge Virus Standard

<sup>7</sup>SAD: Street Alabama Duffering

<sup>8</sup>BHK: Baby Hamster Kidney

<sup>9</sup>TCID: Tissular Culture Infectious Dose

<sup>10</sup>RTX: nomenclatura derivada de Repeats in the Structural Toxin  
(Strathdee y Lo, 1989)

