

Mycobacterium bovis

Cristina Prat Aymerich, Josep Domínguez Benítez y Vicenç Ausina Ruiz

**Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.
Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona**

El nombre específico de “*Bacterium tuberculosis*” fue propuesto por Zopf en 1883 y, en 1896, Lehman y Neumann asignaron las especies al género *Mycobacterium*. A partir de la observación de pequeñas diferencias entre los microorganismos aislados en humanos y en ganado, se distinguió entre *Mycobacterium tuberculosis hominis* y *Mycobacterium tuberculosis bovis*. Las cepas de *hominis* eran aquellas reconocidas como causantes de enfermedad pulmonar en el hombre, y las de *bovis* aquellas responsables de tuberculosis en el ganado, y que podían dar lugar a enfermedad extrapulmonar en el hombre, como consecuencia de la ingestión de leche de vacas infectadas. El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina se describió en 1909, y las investigaciones posteriores concluyeron que, entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar, eran causados por *Mycobacterium bovis*. El nombre fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel.

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

En general, se consideran como agentes etiológicos de la tuberculosis humana: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum* (subtipos I y II), el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y *Mycobacterium microti*. Todas estas especies se integran dentro del complejo de *M. tuberculosis*. Los miembros de este grupo son micobacterias altamente relacionadas, que exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores. La secuencia genómica de *M. bovis* tiene más de un 99,95% de coincidencia con la de *M. tuberculosis*. La supresión de información genética ha dado lugar a un tamaño genómico más reducido. No se han hallado genes únicos de *M. bovis*, hecho que implica que es la diferente expresión génica lo que condiciona el tropismo del bacilo humano y el bovino.

El género *Mycobacterium* incluye parásitos obligados, saprófitos y patógenos oportunistas, pero el hábitat natural de las especies del complejo de *M. tuberculosis* es el tejido infectado de humanos y otros animales mamíferos. *Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos o papagayos. El bacilo de Calmette-Guérin, que es usado como vacuna antituberculosa en diferentes partes del mundo, tiene las mismas propiedades que *M. bovis*, pero con una virulencia más atenuada. *Mycobacterium africanum* es causa de tuberculosis humana en África tropical, y representa una forma intermedia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. *Mycobacterium microti* causa tuberculosis en roedores, y produce lesiones locales en cobayas y conejos. Sin embargo, cualquier miembro del complejo de *M. tuberculosis* puede producir infección en el hombre.

La tuberculosis es la causa más frecuente de muerte en adultos por un único agente infeccioso en el mundo. El agente más común es *M. tuberculosis*, pero una proporción desconocida de casos es debida a *M. bovis*. Se calcula que *M. bovis* es responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis en el mundo. Existe una correlación entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado y la prevalencia en humanos. En países

industrializados, el control de la enfermedad en el ganado y la pasteurización de la leche ha reducido drásticamente la incidencia de infección por *M. bovis*. Sin embargo, la tuberculosis zoonótica está todavía muy presente en animales en países en vías de desarrollo, donde las actividades de control y vigilancia son inadecuadas o no se realizan, y tanto el ganado domesticado como el salvaje, que actúa como reservorio, comparten zonas de pasto. La epidemia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en países en vías de desarrollo, particularmente en aquéllos en los que la infección por *M. bovis* está presente en animales y las condiciones socio-sanitarias favorecen la transmisión zoonótica han convertido esta infección en un serio problema de salud pública.

CUADROS CLÍNICOS

La infección por *M. bovis* es una zoonosis con una amplia variedad de hospedadores mamíferos, pero es primariamente un patógeno bovino. El mecanismo de transmisión en el ganado es por inhalación, y también por ingestión y posterior diseminación hematogena, hasta alcanzar el pulmón. La lesión primaria en el pulmón aparece habitualmente en las áreas dorsales, de localización subpleural, y se acompaña de un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos bronquiales. En el ganado, el 80-90% de las lesiones son pulmonares y, menos frecuentemente, están implicados hígado, riñón o bazo.

La infección primaria en los humanos puede tener lugar por inhalación o por ingestión. Cuando la vía de transmisión es por **inhalación** de aerosoles, a partir de ganado enfermo, se asume que la infección primaria ocurrirá en el pulmón, con mayor probabilidad de reactivación en el tracto respiratorio y ocasional diseminación a órganos distantes. La infección primaria da lugar a un síndrome pseudogripal, con tos seca, y la progresión de la enfermedad puede dar lugar a tos productiva, fatiga, dolor torácico o síntomas tardíos en un lugar extrapulmonar. Cuando la vía de transmisión es la **ingestión** o manipulación de leche contaminada, no pasteurizada, son más frecuentes la linfadenopatía cervical (escrófula), las lesiones intestinales o las cutáneas. Entre cinco y ocho semanas después de la ingesta de *M. bovis*, se inicia fiebre, odinofagia y linfadenopatía cervical. También se han descrito gastralgia y aumento de tamaño de los ganglios mesentéricos, con o sin eritema nodoso. La reactivación tendrá lugar en un órgano abdominal, como la forma clásica de ileítis terminal (signo de la cuerda), o bien en un órgano distante, por diseminación hematogena.

En regiones donde la tuberculosis bovina ha sido eliminada, se presentan algunos casos residuales como resultado de la reactivación de lesiones preexistentes, siendo más frecuentes las formas extrapulmonares. El carácter relativamente microaerófilo de *M. bovis* contrasta con el aerobio de *M. tuberculosis*. Esto explica por qué *M. tuberculosis* se asocia más comúnmente con enfermedad pulmonar, mientras que *M. bovis* se asocia con mayor frecuencia con formas extrapulmonares. El aislamiento en una muestra pulmonar y extrapulmonar de forma concomitante es relativamente frecuente. Entre las formas extrapulmonares destacan la genitourinaria (infrecuente como infección primaria), la linfadenitis y las infecciones osteoarticulares. También se ha descrito la infección conjuntival.

La enfermedad producida por *M. bovis* en humanos es virtualmente indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, tanto clínica como histológicamente. Se considera que *M. bovis* sólo constituye una pequeña proporción de los aislamientos en adultos con tuberculosis debido a que el microorganismo presenta una baja tendencia a la reactivación. En la mayoría de ocasiones no se practica el diagnóstico de especie, y la fuente de infección permanece desconocida.

En la mayoría de los países en vías de desarrollo la tuberculosis es la infección oportunista más frecuente asociada con la infección por el VIH. En general, se considera que *M. bovis* es menos virulento que *M. tuberculosis* en humanos y que, por consiguiente, es menos frecuente la enfermedad post-primaria. De la misma forma, la transmisión

interhumana es rara. Sin embargo, esta diferencia en la virulencia es el resultado de las diferencias en la respuesta inmune del hospedador y, si está inmunodeprimido por el VIH, la enfermedad manifiesta por *M. bovis* puede ser más frecuente. Entre 1995 y 1998 se describió en España un brote de infección por *M. bovis* multirresistente en pacientes infectados por el VIH. El tipaje molecular (RFLP y *spoligo*typing) mostró que una única cepa causó el brote. La cepa presentaba alta transmisibilidad entre los pacientes infectados por ese virus, así como resistencia a la isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida, estreptomina, ácido *p*-aminosalicílico, claritromicina, ofloxacino, capreomicina, cicloserina y amikacina. Respecto a *M. bovis* BCG, existen casos aislados de infección en individuos inmunodeprimidos y pacientes afectados de neoplasia de vejiga urinaria tratados con BCG intravesical.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establece en base a la clínica, epidemiología, observación directa de bacilos ácido alcohol resistentes en muestras del lugar de infección y aislamiento de la micobacteria en cultivo. La diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* se basaba, inicialmente, en las características del cultivo y en morfología colonial, así como en el crecimiento muy lento y disgónico de *M. bovis*. Sin embargo, el crecimiento eugónico de *M. tuberculosis* no se presenta de forma invariable. Las pruebas bioquímicas, muy laboriosas, no se realizan en la mayoría de laboratorios. La identificación de las especies del complejo de *M. tuberculosis* tiene, en general, un interés epidemiológico, pero la distinción es importante al tener en cuenta que *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, usada frecuentemente en los regímenes terapéuticos.

Identificación microbiológica

Las micobacterias son bacilos aerobios, inmóviles y no formadores de esporas, con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared. *Mycobacterium bovis* crece más lentamente que *M. tuberculosis*, es microaerófilo y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. La morfología colonial de *M. bovis* es disgónica y no cromógena.

Identificación bioquímica

Se utilizan diversas pruebas bioquímicas para distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*. A diferencia de este último, las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativas en *M. bovis*, pero el resto de características bioquímicas son indistinguibles: produce catalasa termosensible (positiva a temperatura ambiente e inactivada a 68°C) y la tolerancia a la sal es negativa. El crecimiento en medio Löwenstein-Jensen es pobre en presencia de glicerol, y mejor en presencia de piruvato. El medio BACTEC (Becton Dickinson) no contiene glicerol, por lo que favorece el crecimiento de *M. bovis*. A diferencia de *M. tuberculosis*, el crecimiento de *M. bovis* es inhibido por la TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico) a una concentración de 5 µg/ml. *Mycobacterium bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, como fármaco antituberculoso de primera línea, y una actividad pirazinamidásica defectiva. También se puede diferenciar de *M. africanum* por la resistencia a la pirazinamida. La cepa BCG de *M. bovis* presenta, además, resistencia a la cicloserina, fármaco antituberculoso de segunda línea, así como una fuerte actividad ureásica.

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y, en cualquier caso, el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante. Además, se han descrito cepas de *M. bovis* sensibles a la pirazinamida. En la tabla 1 se describen las principales características de los miembros del complejo de *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Principales características de los miembros del complejo *M. tuberculosis*^a.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Niacina	+	+	-	-
Nitratasa	+	- ^b	-	-
Ureasa	+/-	+	+/-	+
Tipo respiratorio	Aerobio	Microaerófilo	Microaerófilo	Aerobio
TCH (5µg/ml)	R	S ^c	S	S
Pirazinamida	S	S	R ^d	R
Cicloserina	S	S	S	R

^aAbreviaturas. TCH: hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico; S: sensible; R: resistente.

^b+ en la subespecie II.

^cR en la subespecie II.

^dS en la subespecie *caprae*.

Identificación por técnicas de biología molecular

La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medio líquido o sólido permite establecer diagnósticos más rápidos y fiables. La mayor parte de técnicas comercializadas se basan en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias génicas específicas de especies del género *Mycobacterium* que son de utilidad para distinguir los miembros del complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias, pero no entre ellos, debido a la invariabilidad genética de los *loci* más frecuentemente usados como diana. Las técnicas y secuencias más utilizadas son las siguientes:

- **Técnicas de hibridación.** La secuencia más frecuentemente utilizada es la del gen ribosomal que codifica la 16S rRNA, que está bastante conservado, pero tiene zonas variables con secuencias de nucleótidos específicas de género y especie, que son las que se amplifican. Esta secuencia es la diana de las sondas de DNA comercializadas de AccuProbe® (Gen Probe, bioMérieux).
- **Técnicas de amplificación e hibridación con sondas específicas.** El sistema GenoType (Hain Lifescience) utiliza otra secuencia que también contiene regiones conservadas y variables, la que codifica para el 23S rRNA. El sistema Inno-LiPA® Mycobacteria (Innogenetics) combina una técnica de PCR diseñada para amplificar la región espaciadora 16S-23S rRNA (ITS, *internal transcribed spacers*), que muestra mayor variabilidad, seguida de hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa con sondas específicas para varias especies diferentes.
- **Técnicas de amplificación y corte con enzimas de restricción.** El gen *hsp 65* (que codifica la proteína de 65 kD *heat shock protein*) es el que más frecuentemente se amplifica en el sistema PRA (PCR *restriction enzyme analysis*) en que la PCR va seguida de una digestión con dos enzimas de restricción y observación posterior de los fragmentos obtenidos en gel de agarosa tras tinción con bromuro de etidio. Los patrones de restricción obtenidos son específicos de las distintas especies de micobacterias.
- **Secuenciación.** Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de alguno de estos genes. Esta técnica ha permitido describir nuevas especies de micobacterias, particularmente a partir del análisis de 16S rDNA.

A partir de la identificación fenotípica o genotípica como complejo de *M. tuberculosis*, la realización de estudios de sensibilidad (mediante el sistema BACTEC, Becton Dickinson) mostrando **resistencia a la pirazinamida** dará una identificación únicamente presuntiva de *M. bovis*. Se han desarrollado también técnicas de PCR que detectan una mutación puntual en el gen de la enzima pirazinamidasa (**pncA**), ausente en *M. bovis* dando lugar a

resistencia a pirazinamida. Sin embargo, se han descrito subtipos de *M. bovis* sensibles a pirazinamida.

Se han evaluado diversos métodos moleculares para identificar las diferentes especies que integran el complejo de *M. tuberculosis*. Las técnicas basadas en PCR seguida de análisis **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*) son el método de referencia para identificar cepas individuales de *M. tuberculosis*; la secuencia de inserción IS6110, altamente conservada en el DNA de las micobacterias pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis*, presenta numerosas copias en el cromosoma de *M. tuberculosis* (10-20), en localizaciones muy variables, mientras *M. bovis* se caracteriza por contener únicamente entre una y cinco copias del fragmento IS6110. Estas técnicas, por sí solas, no pueden ser utilizadas eficientemente para clasificar taxonómicamente los miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Las cepas con escaso número de copias de IS6110 deben ser tipificadas por la técnica de **spoligotyping** (*spacer oligonucleotide typing*), que detecta la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras variables dentro de la región DR (*direct repeat locus*). Los espaciadores en la región DR son amplificados por PCR y detectados por hibridación del producto de PCR marcado con biotina con una membrana que tiene unidos los oligonucleótidos derivados de las secuencias espaciadoras. Los aislados de *M. bovis* presentan la típica ausencia de los espaciadores 39 a 43. Mediante esta técnica se ha podido distinguir especies sensibles a la pirazinamida, que se han denominado *M. bovis* subtipo *caprae*, detectadas por la ausencia de los espaciadores 3 a 16 como patrón "spoligotype", mientras que el subtipo resistente se ha denominado *M. bovis* subtipo *bovis*.

La capacidad de discriminación mediante *spoligotyping* es aún limitada. La PCR-RFLP de otros genes como *gyrA*, *katG*, *pncA*, *oxyR*, *hsp65* y *gyrB* ha resultado de mayor utilidad, especialmente el análisis del polimorfismo de la secuencia de ***gyrB***. Recientemente, Huard *et al* han desarrollado un panel de tipaje por PCR para el complejo de *M. tuberculosis* que detecta "regiones de diferencia" en diversos *loci* cromosómicos que representan supresiones genómicas que distinguen las diferentes subespecies. Por ejemplo, la ausencia del gen Rv1510 diferencia *M. bovis* y *M. bovis* BCG de las otras subespecies. Usando conjuntamente *primers* para distintas regiones, es posible obtener un patrón de amplificación para cada especie. En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos mediante este panel. Ni esta técnica ni el análisis del polimorfismo de *gyrB* permiten la distinción entre *M. tuberculosis* y *M. africanum* subtipo II.

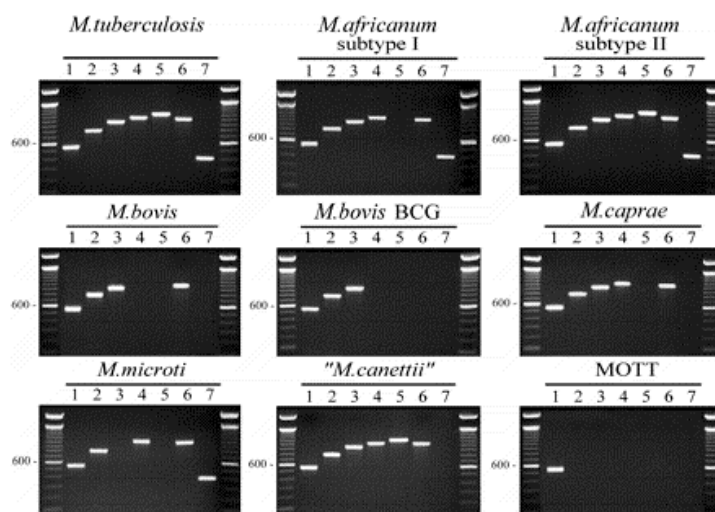


Figura 1. Resultados del panel de tipaje por PCR de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, así como un ejemplo de micobacteria no perteneciente al grupo MOTT (*Mycobacteria other than M. tuberculosis* complex). Tomado de Huard RC *et al* (citado en la Bibliografía).

TRATAMIENTO

Se recomienda tratar la infección por *M. bovis* con cuatro antituberculosos: isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol, excluyendo la pirazinamida si se sospecha esta etiología. Es aconsejable la realización de estudios de sensibilidad con el objetivo de identificar la cepa, así como para excluir resistencias.

COMENTARIOS AL CASO CLÍNICO PRESENTADO EN EL CONTROL

El caso clínico presentado en el control es el de un paciente de 32 años, procedente de Marruecos, que es atendido en el hospital por un cuadro de astenia, anorexia, pérdida de peso y sudor nocturno, tos con escasa expectoración y febrícula de dos meses de evolución. En la radiografía de tórax se observaba un ligero infiltrado no cavitado localizado en el lóbulo superior izquierdo. La prueba de la tuberculina con PPD fue positiva. Se obtuvieron tres muestras consecutivas de esputo para tinción y cultivo de micobacterias. Las tinciones fueron negativas pero, a los 32 días, crecieron en Löwenstein-Jensen unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Aunque en Marruecos se aplican ciertas medidas de control, según el informe presentado por la OMS en 1998 (Cosivi *et al*) se considera que aproximadamente el 85% del ganado y el 82% de la población humana en el continente africano están en áreas donde no se controla, o sólo parcialmente, la tuberculosis bovina. En el caso presentado, la forma de presentación pulmonar, es probablemente secundaria a infección preexistente. El tratamiento empírico aconsejable sería con cuatro fármacos hasta identificación y antibiograma. La cepa presentó un crecimiento lento, compatible con *M. bovis*. En este caso sería recomendable la identificación como perteneciente al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* mediante técnicas fenotípicas o genotípicas, y la realización de estudios de susceptibilidad *in vitro*, por el hecho de tratarse de un paciente inmigrante, con el objetivo de detectar la resistencia a la pirazinamida e identificación presuntiva de *M. bovis*, así como la posible existencia de resistencias asociadas. La identificación por técnicas específicas de biología molecular se reservaría a los laboratorios de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

- ARANAZ A, LIEBANA E, MATEOS A *et al*. Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34:2734-2740.
- BOUVET E, CASALINO E, MENDOZA-SASSI G *et al*. A nosocomial outbreak of multi-drug resistant *Mycobacterium bovis* among HIV infected patients: a case control study. AIDS 1993; 7:1453-1460.
- COLLINS CH, GRANGE JM, YATES MD. Identification of species and variants of tubercle bacilli. En: Organization and practice in tuberculosis bacteriology. Ciudad de publicación: Butterworth and Co Ltd, 1985; pp 59-66.
- COSIVI O, GRANGE JM, DABORN CJ *et al*. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 1998; 4:59-70.
- FANNING EA. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. En: Davies PDO. Clinical tuberculosis. London: Chapman and Hall Medical, 1998; pp 535-550.
- GARNIER T, EIGLMEIER K, CAMUS JC *et al*. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:7877-7882.

- GUERRERO A, COBO J, FORTÚN J *et al.* Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 1997; 350:1738-1742.
- HUARD RC, DE OLIVEIRA LAZZARINI LC, BUTLER WR, VAN SOOLINGEN D, HO JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis complex* on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1637-1650.
- NIEMANN S, HARMSSEN D, RÜSCH-GERDES S, RICHTER E. Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000;38: 3231-3234.
- NIEMANN S, RICHTER E, RUSCH-GERDES S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:152-157.
- ROM WN, GARAY S. Tuberculosis. New York: Little, Brown and Company; 1996.
- SAMPER S, MARTÍN C, PINEDO A *et al.* Transmission between HIV-infected patients of multidrug resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 1997; 11:1237-1242
- SAURET J, JOLIS R, AUSINA V, CASTRO E, CORNUDELLA R. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber Lung Dis* 1992; 73:388-391.
- SCORPIO A, COLLINS D, WHIPPLE D, CAVE D, BATES J, ZHANG Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35:106-110.