

Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control

Luz María López Marín,* Fernando Díaz Otero,** Antonio Javier Vallecillo Maza,**
Hugo Esquivel Solís,** José Ángel Gutiérrez Pabello***

RESUMEN. La tuberculosis (TB) en humanos y bovinos es actualmente un grave problema de salud en Latinoamérica. A más de un siglo de haberse descubierto los agentes causales, el control de esta enfermedad parece lejos de nuestro alcance: la TB humana es responsable de más de cien muertes diarias en esta región, mientras que la TB bovina representa un riesgo de salud pública así como un serio problema económico. En este manuscrito se analiza la situación de la tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica y se presentan estudios realizados en nuestros laboratorios en torno a los factores de virulencia de las bacterias, las características de resistencia intrínsecas del hospedero, y la respuesta protectora inducida en bovinos a través de vacunación o inmunización. Finalmente, se plantea la conveniencia de implantar y/o revisar el uso de herramientas de control actualmente disponibles a fin de abatir la TB en la región.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*

ABSTRACT. Human and bovine tuberculosis (TB) are currently a serious health problem in Latin America. Although the causal agents were discovered more than one century ago, the control of these illnesses is still beyond our reach: human TB accounts for more than one hundred deaths each day in this region, whereas bovine TB represents a public health risk as well as a major economic problem. We herein analyze the situation of human and bovine TB in Latin America, and present studies from our laboratories on bacterial virulence factors, intrinsic resistance features in the host, and the protective response induced in cattle through vaccination or immunization. Finally, the convenience for implementing and/or revising the use of currently available tools for TB control in the region is discussed.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En humanos se trata de uno de los problemas de salud más graves en la actualidad: a nivel mundial, 9 millones de personas desarrollaron TB en 2004 y unas 5,000 personas mueren diariamente a causa de esta enfermedad.⁶ De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*.⁶ La mayoría de estas personas (un 90%) nunca de-

sarrollan la enfermedad, sin embargo los individuos con un sistema inmune comprometido son altamente susceptibles, por lo que situaciones de inmunosupresión, como aquellas ligadas a la pandemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana han contribuido enormemente al recrudecimiento de este padecimiento. Aunque la mayoría de los casos de tuberculosis humana pueden ser tratados con los fármacos actualmente disponibles, la aparición de cepas resistentes a antibióticos de primera y de segunda línea es alarmante, convirtiendo a la TB en una enfermedad intratable de muy fácil transmisión (los bacilos se transmiten por vía aérea al ser diseminados por individuos enfermos tosedores). *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti* son los miembros del complejo *M. tuberculosis* que infectan exclusivamente a humanos,² por otra parte la especie *M. bovis* tiene un espectro de hospederos muy amplio, que incluye bovinos, perros, gatos, cerdos, elefantes, camellos, llamas, jirafas, conejos y seres humanos, entre otros. La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más importantes en el ganado.²⁰ La presencia de esta entidad plantea un impedimento en el desarrollo de

* Instituto de Investigaciones Biomédicas, Dpto. de Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.

** Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca, Km 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

*** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

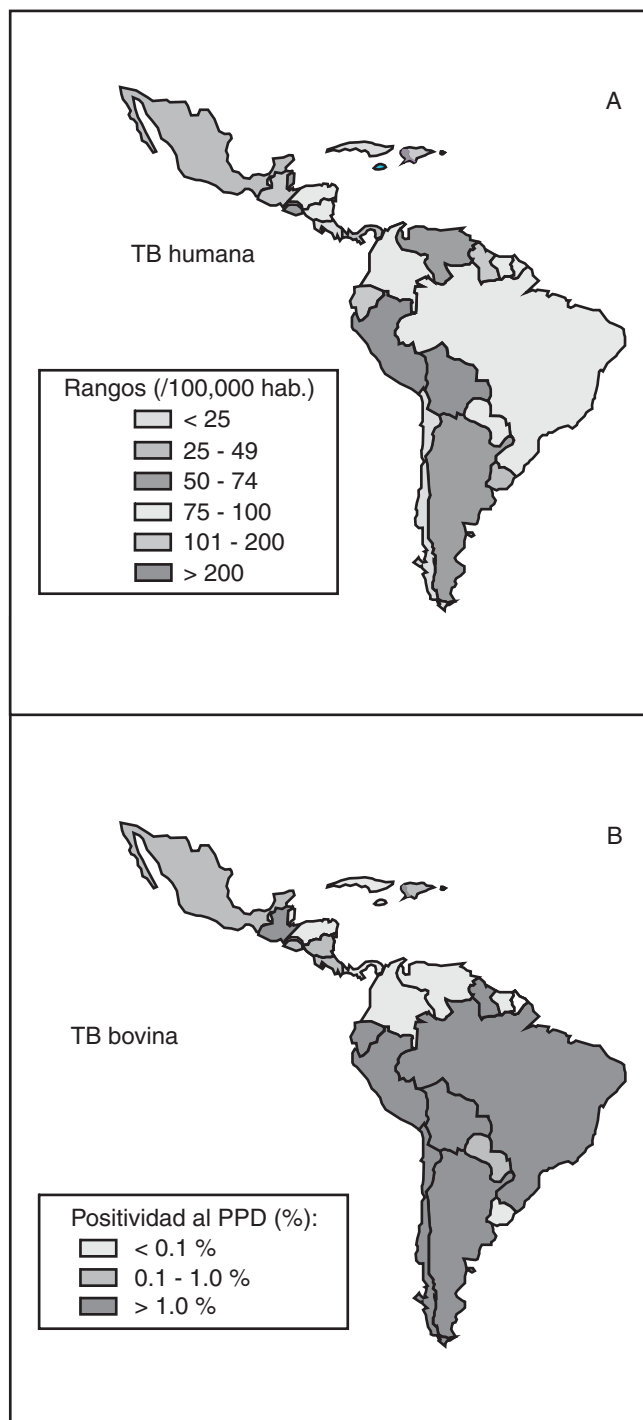


Figura 1. Estimaciones sobre tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica (A) Tuberculosis activa en humanos en 2004 por país. Los rangos corresponden al número de casos estimados por cada 100,000 habitantes según la Organización Mundial de la Salud.⁶ (B) Prevalencia de positividad al PPD en bovinos por país.⁵

la ganadería ya que amenaza la comercialización del ganado y sus subproductos entre regiones de un mismo país, así como entre países. Esta enfermedad es el origen de pérdidas masivas en el área agropecuaria,²⁰ y constituye también una amenaza para la salud de la población humana. Aquí presentamos un resumen de lo discutido durante la mesa redonda “*Mycobacterium*”, dentro del XXXV Congreso de la Asociación Mexicana de Microbiología, en Oaxtepec, Morelos, del 4 al 7 de abril de 2006. En este foro se discutió sobre la TB humana y bovina en Latinoamérica como un problema regional y se presentaron estudios realizados en nuestros laboratorios, no sólo para comprender mejor los factores involucrados en estas enfermedades sino también para evaluar herramientas potenciales para su control.

TUBERCULOSIS HUMANA Y BOVINA EN LATINOAMÉRICA

En América Latina, la TB humana y bovina constituyen un problema de difícil erradicación. Cerca de 350,000 casos de TB activa y más de 50,000 muertes en humanos son los estimados para la región durante el año 2004.⁶ Brasil, Perú y México son los países con mayor carga de casos activos (un 55% del total de casos estimados), aunque no corresponden a aquéllos con mayor incidencia de la enfermedad (Fig. 1A). De acuerdo con estas estimaciones y con los datos notificados por los distintos países de la región, predominaría una falta de detección de la enfermedad, lo cual pone en evidencia la necesidad de contar con métodos de diagnóstico de fácil implementación y bajo costo que permitan la pesquisa de TB activa en nuestras poblaciones. El contar con esta herramienta permitiría brindar un diagnóstico oportuno, disminuyendo así las altas tasas de casos fatales reportadas (en México, por ejemplo, de acuerdo con los datos reportados, dicha tasa rebasa el 17%). La TB bovina, por su parte, es una enfermedad de incidencia variable dentro de Latinoamérica. De acuerdo con la reactividad de bovinos a la prueba de hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina o derivado proteico purificado (PPD), existen regiones con muy baja o nula prevalencia de TB bovina, tales como algunas islas del Caribe, países de prevalencia intermedia, como México y varios integrantes de Centroamérica, y países con una prevalencia alta, como Argentina o Brasil (Fig. 1B).^{6,15} Desafortunadamente, los países productores del 70% de ganado en toda la región son los de mayor prevalencia de TB bovina.⁶ Las pérdidas económicas debidas a la TB son, por lo tanto, sumamente elevadas, y la zoonosis representa un foco de infección para humanos que no puede ser despreciado.^{6,10,15}

El patógeno: componentes potencialmente virulentos pero con utilidad para el diagnóstico

Desde el descubrimiento de *M. tuberculosis* por Robert Koch en 1882, resultó evidente que era ésta una bacteria con una pared celular sumamente peculiar, con claras diferencias respecto a las paredes celulares de otros organismos (Gram-positivos y Gram-negativos). Hubo que desarrollar una tinción especial a fin de poner en evidencia el bacilo y, debido a la extrema impermeabilidad de su envoltura, resultó difícil encontrar antibióticos para combatirlo. Una de las principales características de la pared celular de *M. tuberculosis* es su alto contenido de lípidos (hasta un 60% del peso seco de la bacteria).¹³ Con la secuenciación de su genoma se puso en evidencia que *M. tuberculosis* contiene una gran cantidad de genes que codifican para productos involucrados en la síntesis o el metabolismo de lípidos (250 proteínas, en contraste con unas 50 en *Escherichia coli*).⁵ Los lípidos de pared celular han sido considerados como factores de virulencia sumamente importantes,¹³ pero ninguno en particular es considerado como un factor de virulencia esencial pues la patogenia del bacilo parece ser un fenómeno multifactorial aún mal dilucidado. Por ello, definir factores de virulencia y comprender mejor los eventos que desencadenan resulta fundamental a fin de entender mejor la patogenia de la enfermedad y poder desarrollar nuevas herramientas para su control. Muchos lípidos, además, se encuentran conjugados a azúcares (glicolípidos) y presentan estructuras suma-

mente específicas e inductoras de una respuesta inmune humoral que puede ser explotada para el diagnóstico inmunológico de tuberculosis activa. Luz María López Marín mostró cómo su grupo busca nuevos lípidos con actividad inmunosupresora en extractos de grasas del bacilo tuberculoso. A partir de extractos de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv, así como de otros genotipos, se obtienen fracciones con perfiles cromatográficos específicos. Se rastrean los productos con actividad supresora sobre linfocitos T, *in vitro*, para luego investigar su identidad química. Mediante este procedimiento, el grupo de López Marín encontró dos glicolípidos que, sin mostrar citotoxicidad, son capaces de inhibir la blastogénesis de linfocitos T murinos y humanos. El primero de estos glicolípidos fue identificado como 2,3-di-*O*-acil trealosa o DAT,¹⁸ producto previamente reportado como antígeno prometedor para el diagnóstico serológico de la TB humana, mientras que el segundo de ellos, el de mayor potencia para inducir inmunosupresión, es actualmente analizado a nivel estructural. Otro de los hallazgos del grupo reside en haber encontrado que *M. fortuitum*, micobacteria de crecimiento rápido y de menor riesgo biológico, produce glicolípidos similares al DAT de *M. tuberculosis* y puede por lo tanto servir como fuente alterna para obtener estos reactivos de inmunodiagnóstico, los cuales no son susceptibles de ser producidos por técnicas recombinantes.¹⁴

El hospedero: resistencia natural a la tuberculosis

Es un hecho que varias características del hospedero, tales como la edad, el funcionamiento del sistema inmune, la desnutrición o la presencia de ciertas enfermedades son factores clave para el desarrollo de la tuberculosis activa. Pero además de estos factores, varios estudios han sugerido que tanto en humanos como en animales podría haber factores genéticos que predispongan a la enfermedad.^{12,16} Esto resulta interesante en el caso de la TB bovina, para cuyo control una herramienta prometedora sería la identificación, caracterización y selección de bovinos naturalmente resistentes. La capacidad de controlar con eficiencia una infección es un aspecto poco considerado en la selección de las especies domésticas. La imperante necesidad de proveer mayor volumen de alimento a la población humana, ha centrado la atención sobre cualidades produc-

tivas, sin considerar la resistencia natural de algunos individuos a las enfermedades. Por lo anterior se hace necesaria la generación de un mayor conocimiento sobre los mecanismos de resistencia natural a ciertos patógenos, como *M. bovis*. La resistencia natural a enfermedades se define como la capacidad que tiene un individuo a no enfermarse cuando es expuesto a agentes patógenos sin que haya habido previa exposición o inmunización.¹¹ El grupo de José Ángel Gutiérrez Pabello ha venido estudiando la resistencia a la tuberculosis bovina utilizando la infección de macrófagos bovinos obtenidos de sangre periférica con *Mycobacterium bovis* BCG en un modelo *in vitro* denominado ensayo microbicida.¹⁷ El control del crecimiento intracelular de *M. bovis* virulento también fue evaluado, observándose que la proporción de fagocitosis bacteriana fue

de 1.4 ± 0.17 y 2.1 ± 0.54 bacterias/macrófago, mientras que la multiplicación bacteriana fue de 165 y 263.7% en macrófagos de ganado genéticamente resistente (R) y susceptible (S) a parásitos intracelulares, respectivamente (multiplicidad de infección de 10:1).⁸ De acuerdo con los resultados obtenidos por Gutiérrez Pabello, los ensayos microbicidas también han demostrado su utilidad en la identificación del fenotipo de resistencia en bovinos de una población convencional. Bajo estas condiciones, los macrófagos de ganado clasificado como R y S difirieron significativamente ($P < 0.01$) en el control del crecimiento intracelular de *M. bovis* cepa 9926, virulenta, y *M. bovis* BCG subcepa danesa (avirulenta). Los macrófagos R fueron superiores que los macrófagos S en el control *in vitro* de la replicación bacteriana intracelular. El porcentaje de fagocitosis de ambas cepas fue muy similar ($\pm 40\%$) por macrófagos de animales de ambos fenotipos, sin embargo la supervivencia intracelular de la cepa avirulenta BCG fue de 63.1 y 144.9%, mientras que la cepa virulenta mostró 104.9 y 167.6% de supervivencia en macrófagos de animales resistentes y susceptibles, respectivamente. Otro de los hallazgos en el laboratorio de Gutiérrez Pabello a este respecto ha sido que el fenotipo de resistencia o susceptibilidad a tuberculosis bovina está relacionado con la apoptosis. La apoptosis es un proceso fisiológico cuyo objetivo es eliminar del organismo las células dañadas o no deseadas y juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Gutiérrez-Pabello y colabo-

radores⁹ demostraron por primera vez la inducción de apoptosis en macrófagos bovinos infectados con una cepa virulenta de *M. bovis* utilizando diferentes multiplicidades de infección. Sin embargo, en estos estudios no se analizó este fenómeno asociado al fenotipo de resistencia o susceptibilidad de los donadores. Con el objeto de contestar esta interrogante, los macrófagos de bovinos R y S fueron infectados con *M. bovis* virulento y BCG utilizando una multiplicidad de infección de 10:1. El proceso apoptótico fue caracterizado mediante la identificación de la condensación de la cromatina utilizando una tinción con yoduro de propidio, y la fragmentación del DNA de las células infectadas mediante la técnica de TUNEL. Los resultados demostraron que *M. bovis* indujo apoptosis en los macrófagos de ambos fenotipos, independientemente de la virulencia de la cepa, a partir de las 8 horas post-infección y este fenómeno mostró una tendencia a incrementarse con el tiempo. Por otra parte, se observó que la cepa patógena indujo un mayor grado de apoptosis que BCG, mientras que las células de los bovinos R mostraron una mayor predisposición a sufrir los cambios compatibles con apoptosis (Esquivel Solís, *et al.* manuscrito en preparación). Estos hallazgos indican que los macrófagos de animales resistentes controlan mejor el crecimiento intracelular de *M. bovis* y que son más propensos a sufrir apoptosis que los macrófagos susceptibles, lo cual sugiere que el fenotipo de resistencia del individuo puede jugar un papel importante en el control de la diseminación de *M. bovis*.

La prevención de la TB mediante vacunación

A partir de un aislado de *M. bovis*, los médicos franceses Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron el siglo pasado una cepa atenuada (el Bacilo de Calmette y Guérin o BCG) que es actualmente utilizada como vacuna para humanos en numerosos países. El BCG, que comenzó a ser utilizado en 1921, ha sido la vacuna de mayor uso en el mundo. Pero la protección conferida por esta vacuna varía enormemente, especialmente para el control de la tuberculosis pulmonar, para la cual se ha estimado un 50% de protección en promedio.¹ El desarrollo de vacunas más eficaces resulta apremiante. Sin embargo, tomando en cuenta la emergencia actual de la TB, numerosos expertos señalan la conveniencia de cubrir poblaciones con alta prevalencia de la enfermedad con la vacunación con el BCG, práctica que ha sido adoptada tanto en países en desarrollo como en grupos específicos de países desarrollados.¹⁹ El caso de la prevención de la TB bovina resulta distinto. Para tal efecto, se aplican medidas como la identificación de ani-

males infectados, eliminación y sacrificio, cuarentena de los hatos, y decomiso de órganos y canales. Durante muchos años se ha puesto en tela de juicio la efectividad del BCG para reducir la TB bovina, y un problema que ha impedido su práctica es la interferencia de la vacunación con la prueba de la tuberculina, lo cual condiciona la venta y exportación de animales y sus productos. Fernando Díaz Otero evaluó recientemente el grado de protección conferida por el empleo de la vacuna BCG³ o de proteínas del filtrado de cultivo (CFP, de las siglas en inglés *culture filtrate proteins*) de *M. bovis* contra la TB bovina, así como el efecto inmunomodulador del interferón-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) en la respuesta de bovinos inmunizados con CFP. Para ello utilizó becerras Holstein de 8-12 meses de edad, sanas, y evaluó la protección al reto con una cepa silvestre de *M. bovis* (vía intratraqueal) en 4 grupos de animales: un grupo control no inmunizado, un segundo grupo inmunizado con CFP de *M. bovis*, un tercer grupo inmunizado con CFP

de *M. bovis* + IFN γ , y un cuarto grupo vacunado con *M. bovis* BCG cepa Pasteur. De acuerdo con los resultados obtenidos, aunque los tres grupos de animales tratados presentaron una reducción en el grado y extensión de lesiones con respecto al grupo control, fue la inmunización con BCG la que mayor protección confirió, tanto por la reducción de las lesiones a nivel histopatológico como por la mayor producción de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica. Dos animales del grupo vacunado con el BCG se mostraron, inclusive, libres de lesiones, mostrando que el uso del BCG podría ser una excelente herramienta para disminuir la TB bovina.

CONCLUSIONES

En América Latina, la TB es actualmente un problema de salud grave que se encuentra lejos de ser erradicado tanto en humanos como en bovinos. La identificación rutinaria del fenotipo de resistencia en los bovinos, en conjunto con la selección y cruzamientos dirigidos, ayudarían a incrementar el nivel general de resistencia genética de los hatos lo cual tendría un impacto económico favorable en la industria ganadera. Para el desarrollo de mejores herramientas de control, como nuevas vacunas y fármacos, es necesario ahondar sobre el conocimiento de la bacteria así como de su interrelación con el hospedero. El descubrimiento de nuevos factores de virulencia y de las vías biosintéticas correspondientes resulta de particular interés y entre dichos factores resaltan los glicolípidos, ya que son compuestos sumamente específicos. Sin embargo, además del avance en conocimientos básicos, la situación actual de emergencia requiere que herramientas actualmente disponibles sean implantadas para mejorar el control de la TB. Una de las herramientas propuestas para mejorar el diagnóstico de TB humana fue el uso de glicolípidos como reactivos de diagnóstico. Finalmente, para controlar la TB bovina, nuestras conclusiones fueron que el uso del BCG en bovinos deberá ser reconsiderado, puesto que, gracias al conocimiento actual de los genomas, resulta ahora factible el desarrollo de métodos que logren diferenciar con claridad los animales vacunados con BCG de los infectados con *M. bovis*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de los financiamientos PAPIIT (Proyectos IN-218506 para LMLM e IN-219999 para JAGP), y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyectos 34833-B y Texas A&M-CONACYT 3-051002-7 para JAGP, y D-43244-Z para FDO).

REFERENCIAS

1. Brewer, T. F. 2000. Preventing tuberculosis with Bacille Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. Clin. Infect. Dis. 31: S64-S67.
2. Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen & S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 3684-3689.
3. Buddle, B. M., J. M. Pollock, M. A. Skinner & D. N. Wedlock. 2003. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int. J. Parasitol. 33: 555-566.
4. Caffey, J.P. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. Vet. Microbiol. 40:1-4.
5. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393: 537-544.
6. De Kantor, I. N., & V. Ritacco. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet. Microbiol. 112: 111-118.
7. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO TB Report 2006, World Health Organization, Geneva. 2006.
8. Gutiérrez-Pabello, J.A., Adams, L.G., 2003. Survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from cattle naturally resistant and susceptible to intracellular pathogens. Vet. Mex. 34:277-281.
9. Gutiérrez-Pabello, J.A., D. N. McMurray, & L. G. Adams. 2002. Upregulation of thymosin beta-10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. Infect. Immun. 70 (4):2121-2127.
10. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* – New York City, 2001 – 2004. 2005. Mortality and Morbidity Weekly Report. 54: 605-608.
11. Hutt, F.B. 1958. Genetic resistance to disease in domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, 198 pp.
12. Kramnik, I. & V. Boyartchuk. 2002. Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. Curr. Opin. Microbiol. 5:111-117.
13. Kremer, L. & G. S. Besra. 2005. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*, pp. 287-305. In S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs, Jr. (Eds). Tuberculosis and the tubercle bacillus, American Society for Microbiology, Washington D. C.
14. López Marín, L. M., E. Segura, C. Hermida-Escobedo, A. Lemassu & M. C. Salinas-Carmona. 2003. 6,6'-dimycoloyl trehalose from a rapidly growing *Mycobacterium*: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 36: 47-54.
15. OIE (World Organization for Animal Health), 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. Accessed May 3, 2006. Available from: <http://www.oie.int>.
16. Pan, H., B. S. Yan, M. Rojas, Y. V. Shebzukhov, H. Zhou, L. Kobzik, D. E. Higgins, M. J. Daly, B. R. Bloom & I. Kramnik. 2005. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. Nature. 434: 767-772.
17. Qureshi, T., J. W. Templeton, & L. G. Adams. 1995. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 50:55-66.

18. Saavedra, R., E. Segura, E. P. Tenorio & L. M. López Marín. 2006. Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T cells. *Microbes Infect.* 8: 533-540.
19. Tala, E. O. & M. M. Tala-Heikkila. 1994. Pros and cons of BCG vaccination in countries with low incidence of tuberculosis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15: 497-499.
20. Thoen, C., P. LoBue & I. De Kantor. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112: 339-345.

Correspondencia:

Luz María López Marín

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Apdo. Postal 70-228, Ciudad Universitaria
Coyoacán, 04510, México, D. F.
Tel. (5255) 56-22-3150, Fax (5255) 56-22-3369
E-mail: lmlm@servidor.unam.mx