



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Evaluación de los factores promotores de resucitación como impulsores del crecimiento de *Mycobacterium bovis* en cultivos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

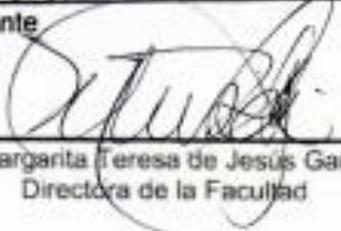
M.V.Z. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

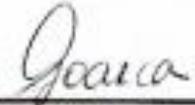
Codirigido por

M. en C. Susana Flores Villalva
Dr. Feliciano Milián Suazo

SINODALES

Dr. Feliciano Milián Suazo
Presidente
M. en C. Susana Flores Villalva
Secretario
Dra. Elba Rodríguez Hernández
Vocal
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Suplente
M. en C. Susana Lucía Sosa Gallegos
Suplente


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 17
México



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN
ANIMAL SUSTENTABLE**

**Evaluación de los factores promotores de resucitación
como impulsores del crecimiento de *Mycobacterium
bovis* en cultivos**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

M.V.Z. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

Codirigido por

M. en C. Susana Flores Villalva

Dr. Feliciano Milián Suazo

Asesores

Dra. Elba Rodríguez Hernández

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

M. en C. Susana Lucía Sosa Gallegos

Santiago de Querétaro, Qro., noviembre de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE

Evaluación de los factores promotores de resucitación como impulsores
del crecimiento de *Mycobacterium bovis* en cultivos

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

Codirigido por

M. en C. Susana Flores Villalva

Dr. Feliciano Milián Suazo

Asesores

Dra. Elba Rodríguez Hernández

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

M. en C. Susana Lucía Sosa Gallegos

Santiago de Querétaro, Qro., noviembre de 2017

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el crecimiento de bacterias dormantes y activas de *Mycobacterium bovis* AN5. Se emplearon cuatro concentraciones de proteína total: 15, 30, 60 y 120 µg, para RipA y RpfB, y una combinación RipA + RpfB; en medios Middlebrook 7H9 y 7H10. Como control positivo se utilizó filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* (F.C. 120 µg) y un control negativo (sin proteína). Para hacer la reactivación, las bacterias fueron previamente inducidas a dormancia poniéndolas cuatro meses en medio mínimo Sauton, donde se les privó de nutrientes y oxígeno. Para confirmar el estado en que se encontraban las bacterias, el cultivo se evaluó cada 15 días para medir la densidad óptica (D.O. 600nm), también por conteo de bacterias totales en cámara de Neubauer y conteo de UFC en medio sólido. Posteriormente se adicionaron las proteínas en los medios sólidos y líquidos con bacterias dormantes o activas. En los medios sólidos se evaluó la capacidad de formar colonias con y sin proteína. En los medios líquidos se tomaron lecturas de la D.O. cada tres días durante 12 días y a este día se realizó el conteo en Neubauer. Para determinar diferencia significativa entre los tratamientos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con la utilización de RipA en bacterias activas en la formación de colonias en medio sólido. Para la combinación RipA + RpfB no se observó diferencia estadística ($P > 0.05$); sin embargo, se observó formación de colonias a partir de los dos días de cultivo. Para los medios líquidos, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en la evaluación de D.O. para la adición de RipA en bacterias dormantes y activas, RpfB en bacterias dormantes y RipA + RpfB en bacterias dormantes; en el conteo con la cámara de Neubauer se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) para RipA, RpfB y RipA + RpfB. Por lo que se puede concluir que ambas proteínas promueven el crecimiento de *M. bovis* en estado activo o dormante, siendo mejor el efecto al usarlas en conjunto.

(Palabras clave: Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, dormancia bacteriana, reactivación bacteriana, proteínas recombinantes: RipA, RpfB).

SUMMARY

In this work, the activity of RipA and RpfB recombinant proteins were evaluated in dormant and active *Mycobacterium bovis* AN5 bacteria. Four concentrations of total protein were used 15, 30, 60 and 120 µg for RipA and RpfB, and a combination of both; cultures were done in quadruplicate in Middlebrook 7H9 broth with OADC enrichment and 20% Tween 80 and Middlebrook 7H10 agar with OADC enrichment. Also, as a positive control a culture filtrate of *Mycobacterium bovis* (F.C. 120 µg) and a negative control (without protein), were used, for dormant and for active bacteria. Before reactivation of the dormant bacteria, they were induced to dormancy for four months in Sauton minimal medium, where they were deprived of nutrients and oxygen. Dormant state was evaluated every 15 days defining optical density (O.D. 600nm) measurements, counting in Neubauer chamber and CFU counting on 7H10 media. Then proteins were added to the solid and liquid media with dormant or active bacteria. In the 7H10 media the ability to form colonies with and without protein was evaluated in 7H9 media. The OD was evaluated every three days for 12 days, and at this day bacteria were counted in Neubauer chamber. The Kruskal-Wallis test was used to determine significant difference between groups. Significant difference ($P < 0.05$) was observed in CFU when using RipA in active bacteria. When using RipA + RpfB no statistical difference was found ($P > 0.05$), however, formation of colonies at two days of culturing was observed. Statistical difference ($P < 0.05$) was observed in the evaluation of OD in 7H9 media for the use of RipA in dormant and active, as well as for RpfB in dormant bacteria and RipA + RpfB in dormant bacteria. The same was observed for the Neubauer chamber counts ($P < 0.05$) for RipA, RpfB and RipA + RpfB treatments.

(Key words: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, bacterial dormancy, bacterial reactivation, recombinant proteins: RipA, RpfB).

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Camelia y Alán por enseñarme a ser la persona que soy y permitirme llevar a cabo todos mis sueños e impulsarme para lograrlos. Quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida, que me han formado y educado. A quienes la ilusión de su existencia ha sido verme convertida en una persona de provecho. A quienes nunca podré pagar ni con las riquezas más grandes del mundo. A ellos los seres más queridos, sinceramente Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

De igual manera agradezco al INIFAP, quien a través del CENID Fisiología otorgó el financiamiento para la ejecución de este proyecto. Proyecto fiscal No. SIGI 14262633066.

Agradezco a la Dra. Clara Espitia Pinzón y en particular a la M. en C. Cristina Parada Colín y M. en C. Erika Segura del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la UNAM, quienes proporcionaron los filtrados de cultivo empleados en el presente trabajo.

Quiero agradecer a mi codirectora externa, la M. en C. Susana Flores Villalva, sus conocimientos invaluable que me brindo para llevar a cabo esta investigación, y sobre todo su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin.

Agradezco a mi asesora, la M. en C. Susana Lucia Sosa Gallegos por sus enseñanzas y paciencia con mi trabajo de laboratorio.

Agradezco a los miembros de mi comité, el Dr. Feliciano Milián Suazo, la Dra. Elba Rodríguez Hernández y el Dr. Germinal Jorge Cantó, por su comprensión, nobleza y sus valiosas contribuciones que hicieron al presente trabajo, así como por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.

Agradezco a Gilberto Reyes de Luna, Jonathan Alexander Agredo Palechor y Yunier Hernández Cruz, por su ayuda en el laboratorio durante mi trabajo experimental.

Agradezco a Lola por su compañía durante esas largas noches de trabajo.

Agradezco a mi hermana Eleonora y mi hermano José por su apoyo y comprensión.

Quiero agradecer especialmente a dos personas muy importantes, de las cuales una me enseñó cosas importantes en mi persona y la otra, siempre ha estado a mi lado.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	4
2.2 DISTRIBUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	6
2.3 GENERALIDADES DE LAS MICOBACTERIAS	6
2.4 Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública	8
2.5 PATOGENIA PRODUCIDA POR MYCOBACTERIUM BOVIS	10
2.6 TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA ENTRE EL GANADO	12
2.7 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	13
2.8 DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	15
2.8.1 Diagnóstico ante-mortem	15
2.8.2 Diagnóstico post-mortem	18
2.8.2.1 Cultivo y aislamiento bacteriano	19
2.9 DORMANCIA Y LATENCIA DE MYCOBACTERIUM BOVIS	20
3. REACTIVACIÓN CELULAR	22
3.0.1 Factor promotor de resucitación B (RpfB)	24
3.0.2 Proteína de secreción (RipA)	24
III OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS	27
4.1.1 Middlebrook 7H9 + OADC + Tween 80 al 20%	27
4.1.2 Middlebrook 7H10 + OADC	27
4.2 PREPARACIÓN DE INÓCULOS DE BACTERIAS ACTIVAS	27
4.3 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)	28
4.4 CRECIMIENTO DE M. BOVIS PARA OBTENCIÓN DE CÉLULAS ACTIVAS	28
4.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE LAVADO Y DE CULTIVO SIN ENRIQUECIMIENTO PARA CINÉTICA BACTERIANA	28
4.5.1 Medio mínimo Sauton	28
4.6 DORMANCIA BACTERIANA	29
4.6.1 Filtrado de los cultivos	30
4.6.2 Evaluación de la viabilidad celular	30
4.6.3 Conteo microscópico	30
4.7 RESUCITACIÓN DE CÉLULAS	31
4.8 CONTROLES DE CULTIVO	32

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
V. RESULTADOS	33
5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	33
5.2 DORMANCIA BACTERIANA	33
5.2.1 Conteo en placa de la dormancia	34
5.2.2 Conteo microscópico del tiempo de dormancia bacteriana	35
5.3 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RIPa, RPFb Y LA COMBINACIÓN DE AMBAS EN MEDIO MIDDLEBROOK 7H10 EN EL AUMENTO (BACTERIAS ACTIVAS) Y REACTIVACIÓN (BACTERIAS DORMANTES) DE M. BOVIS MEDIANTE EL CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.	36
5.3.1 Evaluación de RipA en el aumento de bacterias activas	36
5.3.2 Evaluación de RipA en la reactivación de bacterias dormantes	37
5.3.3 Evaluación de RpfB en el aumento de bacterias activas	38
5.3.4 Evaluación de RpfB en la reactivación de bacterias dormantes	39
5.3.5 Evaluación de RipA y RpfB en el aumento de bacterias activas	40
5.3.6 Evaluación de RipA y RpfB en la reactivación de bacterias dormantes	41
5.4 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RIPa Y RPFb EN MEDIO LÍQUIDO MIDDLEBROOK 7H9 EN EL AUMENTO DE BACTERIAS ACTIVAS DE M. BOVIS	42
5.5 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RIPa Y RPFb EN MEDIO LÍQUIDO MIDDLEBROOK 7H9 EN LA REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS DORMANTES DE M. BOVIS	43
5.6 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RIPa Y RPFb EN MEDIO MIDDLEBROOK 7H9 EN EL AUMENTO DE BACTERIAS TOTALES EN ESTADO ACTIVO Y DORMANTE DE M. BOVIS MEDIANTE MICROSCOPIA (CÁMARA DE NEUBAUER) A LOS 12 DÍAS POST-INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS CON LA PROTEÍNA.	44
5.6.1 Evaluación de RipA en el aumento de bacterias activas	44
5.6.2 Evaluación de RipA en la reactivación de bacterias dormantes	45
5.6.3 Evaluación de RpfB en el aumento de bacterias activas	46
5.6.4 Evaluación de RpfB en la reactivación de bacterias dormantes	47
5.6.5 Evaluación de RipA y RpfB en el aumento de bacterias activas	48
5.6.6 Evaluación de RipA y RpfB en la reactivación de bacterias dormantes	49
VI. DISCUSIÓN	51
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. LITERATURA CITADA	58
IX. ANEXO 1	70
X. ANEXO 2	71
XI. ANEXO 3	72
XII. ANEXO 4	73
XIII. ANEXO 5	74
XIV. ANEXO 6	75
XV. ANEXO 7	76
XVI. ANEXO 8	77
XVII. ANEXO 9	78
XVIII. ANEXO 10	79
XIX. ANEXO 11	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Genes que codifican proteínas que contienen un dominio de Rpf en diferentes microorganismos	23
2	Concentración de proteínas recombinantes a evaluar en medios sólido (7H10 + OADC) y líquido (7H9 + OADC + Tween 80 al 20%) para el crecimiento de <i>M. bovis</i>	31
3	Conteo de UFC de la dormancia	34
4	Concentración de proteína con bacterias activas	50
5	Concentración de proteína con bacterias dormantes	50
6	Promedio y desviación estándar del conteo de UFC con proteína RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes	70
7	Promedio y desviación estándar de la densidad óptica con proteína RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes.	71
8	Promedio y desviación estándar del conteo en Neubauer RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Árbol filogenético de micobacterias	8
2	Factores relacionados con el control de la tuberculosis bovina	14
3	Cinética de crecimiento de <i>M. bovis</i> AN5	33
4	Dormancia de <i>M. bovis</i> AN5	34
5	Conteo bacteriano en cámara de Neubauer del tiempo de dormancia en medio Sauton	35
6	Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento de las UFC en cultivo 7H10	36
7	Efecto de la proteína recombinante RipA sobre la reactivación de las UFC en cultivo 7H10	37
8	Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento de las UFC en cultivo 7H10	38
9	Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre la reactivación de las UFC en cultivo 7H10	39
10	Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento de las UFC en cultivo 7H10	40
11	Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre la reactivación de las UFC en cultivo 7H10	41
12	Efecto de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y la combinación (RipA + RpfB) sobre el aumento de la densidad óptica de bacterias activas en medio 7H9	42
13	Efecto de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y la combinación (RipA + RpfB) sobre el aumento de la densidad óptica de bacterias activas en medio 7H9	43
14	Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento del número total de bacterias activas en medio 7H9	44
15	Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento del número total de bacterias dormantes en medio 7H9	45
16	Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas en medio 7H9	46
17	Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas en medio 7H9	47

18	Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas en medio 7H9	48
19	Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas en medio 7H9	49
20	Densidad óptica por día de muestreo de RipA con bacterias activas	73
21	Densidad óptica por día de muestreo de RipA con bacterias dormantes	74
22	Densidad óptica por día de muestreo de RpfB con bacterias activas	75
23	Densidad óptica por día de muestreo de RpfB con bacterias dormantes	76
24	Densidad óptica por día de muestreo de RipA + RpfB con bacterias	77
25	Densidad óptica por día de muestreo de RipA + RpfB con bacterias dormantes	78
26	Espectrofotometría a los 12 días de muestreo de RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas	79
27	Espectrofotometría a los 12 días de muestreo de RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias dormantes	80

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades infectocontagiosas que se vigila constantemente y de las que se exige su notificación obligatoria una vez confirmada su presencia, se encuentra la tuberculosis bovina (BTB). Esta enfermedad es provocada por *Mycobacterium bovis*, perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, género Mycobacterium. Dicha bacteria, a pesar de ser un patógeno primario para los bovinos, tiene un rango excepcionalmente amplio de hospederos vertebrados, entre los cuales se incluyen animales de interés económico (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, aves), animales de compañía, silvestres y los seres humanos (Ramdas et al., 2012; Buddle et al., 2015).

El interés mundial en el control y erradicación de la BTB se justifica tradicionalmente no solo por el deterioro cuantitativo y cualitativo de los principales indicadores productivos y reproductivos que provoca en esta especie, sino además por los incrementos en los costos de producción que genera su diagnóstico, las pérdidas económicas debido al sacrificio sanitario aplicado para su control; su transmisibilidad hacia los humanos; y por las persistentes e inmediatas restricciones comerciales que se les aplican a las producciones ganaderas procedentes de los países afectados (Müller et al., 2013; Hawn et al., 2014).

La infección de los bovinos con *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es la causa de la tuberculosis bovina (BTB), enfermedad que sigue siendo un problema económico importante en muchos países, se ha estimado que aproximadamente 50 millones de bovinos están infectados con *M. bovis* (Shu et al., 2014).

La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación alrededor del mundo, donde la tuberculina es la prueba *ante-mortem* autorizada por la Organización Mundial en Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en inglés) (Rothel et al., 1990; de la Rúa-Domenech et al., 2006; Gormley et al., 2006). Tras el sacrificio, se realiza un examen post-mortem para buscar lesiones sugestivas a BTB, las cuales se analizan por técnicas

histopatológicas y bacteriológicas (Corner, Gormley & Pfeiffer, 2012). A la fecha, la “prueba de oro” en todo el mundo es el cultivo. No obstante; la BTB sigue manifestándose como un problema en el ganado debido a diversos factores, entre ellos las limitaciones en la especificidad y sensibilidad de los métodos actuales de diagnósticos (Ramos, Silva & Dellagostin, 2015).

Las micobacterias requieren medios enriquecidos para crecer, los medios utilizados tradicionalmente son: Stonebrink y Lowenstein-Jensen ya que presentan una menor tasa de contaminación, aunque su rendimiento no siempre sea óptimo. Los medios Middlebrook 7H10 o 7H11 permiten una tasa de crecimiento más rápida, de 28 días, a diferencia de los 36 días con medio Stonebrink; sin embargo, estos medios son más susceptibles al crecimiento de microorganismos contaminantes (Hines, Payeur & Hoffman, 2006). El intervalo generacional de *M. bovis* es de 16-20 horas, por lo que los cultivos se deben incubar hasta por ocho semanas (de preferencia 10 - 12 semanas) a 37°C en una atmosfera enriquecida con dióxido de carbono (CO₂) al 5% (Corner, 1994). Todo esto limita el diagnóstico de la BTB y las subsecuentes pruebas de genotipificación. La necesidad de obtener un diagnóstico más rápido y certero ha motivado el desarrollo de sistemas de detección rápidos, conocidos como cultivos rápidos, los cuales se basan en la detección de CO₂ radioactivo; sin embargo, estos sistemas son caros y el laboratorio debe tener la infraestructura necesaria para el manejo de radioisótopos, lo que limita su uso general (Wood & Jones, 2001).

Los factores promotores de resucitación (Rpf, por sus siglas en inglés) fueron originalmente descritos en *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) por su capacidad de incrementar el número de células cultivables en poblaciones latentes y reducir el tiempo de crecimiento (Mukamolova et al., 2002b; Zhang, 2004). *M. bovis* cuenta con cinco genes Rpf homólogos, los cuales tienen propiedades similares a las proteínas Rpf de *M. luteus* (Zhu, Pliikaytis & Shinnick, 2003). La capacidad de las proteínas Rpf de *M. bovis* de promover el crecimiento de micobacterias ha sido evaluada en diversos estudios, a través de la suplementación de filtrados de cultivos conteniendo estos factores; no obstante, la obtención del filtrado de cultivo de *M.*

bovis es complicada y riesgosa, se requiere trabajar en instalaciones de bioseguridad nivel III y personal altamente calificado. Por lo cual se promueve el uso de proteínas recombinantes obtenidas en organismos no patógenos (Mukamolova et al., 2002b).

Las proteínas RipA y RpfB pueden ser usadas en el aislamiento de *M. bovis* a partir de diversas muestras: tejidos, leche, calostro, esputo, etcétera. Su uso podría disminuir el tiempo de cultivo de la micobacteria que usualmente es de ocho a 12 semanas; la obtención de un diagnóstico certero en un menor tiempo (dos a cuatro semanas) favorecerá las acciones de control y erradicación, y al mismo tiempo facilitará los estudios epidemiológicos de la enfermedad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de la tuberculosis bovina

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) engloba a todas las especies capaces de causar enfermedad en el humano. Siendo el principal agente *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que es el agente causal de la tuberculosis bovina (BTB) también forma parte de este complejo; otros miembros del complejo incluyen a *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microtti*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium caprae* (Kleeberg, 1984; Thoen & Barletta, 2006).

La BTB es una enfermedad crónico-infecciosa, producida por *M. bovis*, y se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en los órganos comprometidos. La BTB es frecuente en países subdesarrollados y causa graves pérdidas económicas por la disminución en la producción del ganado, la eliminación del ganado infectado y por las restricciones en la comercialización. Por lo tanto, es un factor que limita el desarrollo de la industria lechera y de la carne en el comercio internacional, por lo que es esencial controlar y erradicar esta enfermedad (Blanco et al., 2011). No obstante, la BTB es una enfermedad difícil de controlar debido a la gran cantidad de especies susceptibles, patogénesis y la limitada eficacia de los métodos de diagnóstico actualmente disponibles. De hecho, la TB causada por *M. bovis*, fue diagnosticada por primera vez en el búfalo africano en el Parque Nacional Kruger de Sudáfrica en el año 1986, más tarde fue documentado el contagio a leones, papión chacma, potamóquero de río y kudú mayor (Michel et al., 2006).

El control efectivo requiere una comprensión de la epidemiología de la infección en el sistema ecológico que puede incluir especies de animales domésticos, así como salvajes. También se ve afectado por las prácticas de gestión en el sistema de producción ganadera, así como las consideraciones sociales hacia la aplicación del control de especies reservorio de animales salvajes (Kaneene & Pfeiffer, 2008).

Debido a las medidas de control inadecuadas, *M. bovis* ha tenido resurgimiento en las naciones industrializadas debido a las poblaciones de animales reservorios, inmigración de áreas endémicas e importación de alimentos infectados o productos de origen animal. Además del ganado, el portador primario de *M. bovis*, se ha demostrado que más de 20 especies de mamíferos albergan al patógeno. Existe una correlación directa entre la diversidad de especies de vectores y la propagación de la tuberculosis causada por *M. bovis*. Además, los hacinamientos de especies múltiples confunden la erradicación de *M. bovis* en las poblaciones de ganado, al permitir que la enfermedad pase libremente entre diferentes especies que comparten hábitats (Han et al., 2015). Entre las especies ganaderas de importancia económica susceptibles a la infección se encuentran las vacas, cabras y cerdos (Crawshaw et al., 2008; Navarro et al., 2008). Otras especies afectadas son el búfalo, ovejas, camellos, alpacas, llamas, caballos, perros, gatos (Cousins, 2001). Además, se ha aislado de una amplia gama de animales salvajes de vida libre, como los zorros, ciervos, jabalíes, tejones, zarigüeyas, linceos, liebres, coyotes, y primates no humanos, entre otros (Corner, 2006; Une & Mori, 2007).

Algunas especies son ya consideradas reservorios de la infección, por lo que se incluyen como relevantes en las campañas de erradicación y el control. Por ejemplo, el tejón en Reino Unido y la República de Irlanda, el venado de cola blanca en Estados Unidos, la zarigüeya en Nueva Zelanda, el búfalo en África y el cerdo salvaje en España (Michel et al., 2006; Palmer, 2007; Naranjo et al., 2008; Tortoli, 2009).

La enfermedad en el ganado genera una disminución de la productividad y, por ello, las pérdidas tienen una relación directa con la prevalencia (Bennett & Cooke, 2006; Rivera, Jiménez & Deward, 2009; Boland et al., 2010). Esta enfermedad causa aproximadamente una disminución en un 10 al 20% de la producción lechera y cárnica, así como una disminución de un 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños; todo ello unido a la restricción en la venta y/o exportación de carne proveniente del animal (Bennett & Cooke, 2006; Boland et al., 2010).

Se ha estimado el impacto financiero global anual de la tuberculosis bovina en tres mil millones de dólares (Tomley & Shirley, 2009).

2.2 Distribución de la tuberculosis bovina

La distribución geográfica de la BTB ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Antes de la introducción de medidas de control y la pasteurización de la leche en los países desarrollados, la tuberculosis estaba ampliamente distribuida en todo el mundo (FAO, 2012).

Los programas de erradicación basados en políticas de vigilancia y de pruebas de detección y sacrificio de los animales infectados, destinadas a depurar los hatos, prácticamente eliminaron la tuberculosis del ganado en muchos países desarrollados. Hoy, muchos países de Europa y América del Norte, así como Australia, están libres de la enfermedad o a punto de erradicarla totalmente del ganado. Sin embargo, el mantenimiento de la infección por *M. bovis* en especies silvestres ha comprometido considerablemente los intentos de erradicación en países como Irlanda, Nueva Zelanda, el Reino Unido de Gran Bretaña, Irlanda del Norte y en partes de los Estados Unidos de América (Thoen, Lobue & de Kantor, 2009).

En México, se busca la eliminación de la tuberculosis en el ganado principalmente por razones económicas; dado que México exporta un promedio de 1,2 millones de terneros cada año a los Estados Unidos y solo los estados que se encuentran libres de BTB pueden exportar. Esta limitación representa un problema para los estados que no tienen acreditación de la condición de libre de enfermedad, ya que los movimientos de animales están prohibidos, no sólo a los países extranjeros, sino también a otros estados dentro del país (Zendejas et al., 2007).

2.3 Generalidades de las micobacterias

Según el Manual Bergey's de Systematic Bacteriology (2012), el género *Mycobacterium* está encuadrado en el filo Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Actinomycelates, suborden Corynebacterineae, familia Mycobacteriaceae.

Este género comprende más de 120 especies y se encuentran descritas bacterias saprófitas, patógenas oportunistas y patógenas estrictas del hombre y los animales. Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y la ácido-alcohol resistencia.

De las 80 especies reconocidas como tales en el género *Mycobacterium*, 41 se consideran micobacterias de crecimiento rápido. Aunque la mayoría son conocidas desde la antigüedad, muchas han sido descritas en los últimos años, algunas de ellas en nuestro país (Esteban, Fernández & Soriano, 2000). Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de especies saprofitas de vida libre, ampliamente distribuidas en el medio ambiente (Tortoli, 2009; Castilho et al., 2015). Estas pueden causar enfermedad en presencia de factores predisponentes (Castilho et al., 2015). Frecuentemente se les denomina “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas”. Dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días (Figura 1) (Tortoli, 2009).

El grupo de micobacterias de crecimiento lento engloba las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública. En este grupo se encuadra el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* complex, MTBC), que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y en mamíferos; estas tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido. Figura 1 (Pollock & Neill, 2002). En este grupo se incluye a *M. bovis* el antígeno etiológico de la BTB (Thoen & Barletta, 2004).

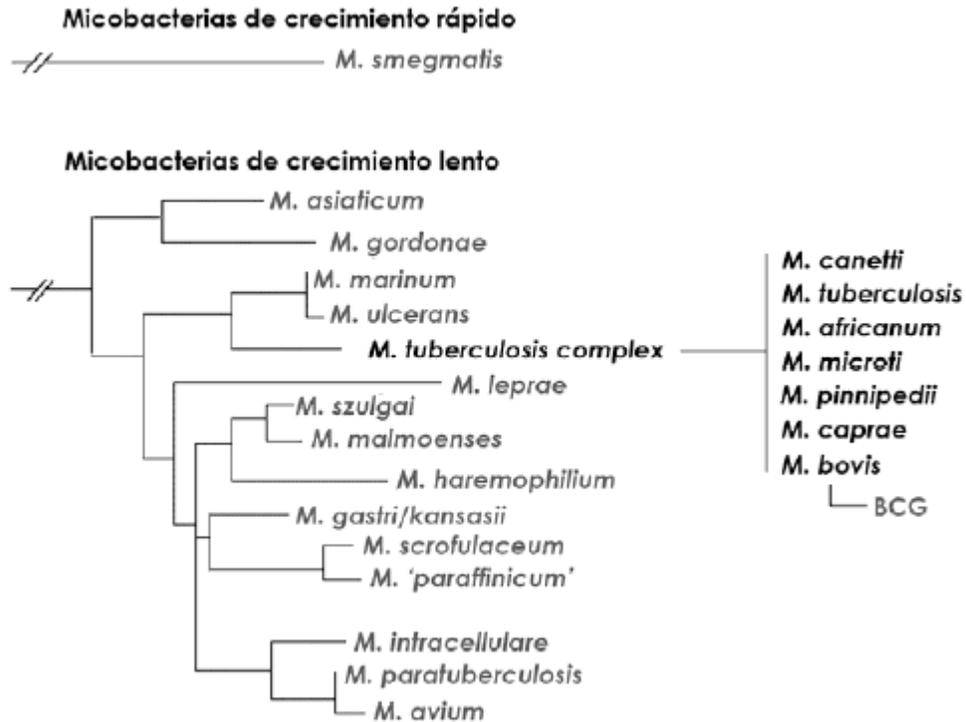


Figura 1. Árbol filogenético de micobacterias de crecimiento rápido y lento (Biet et al., 2005).

2.4 Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública

Generalmente se considera que el ser humano es un huésped secundario para la infección por *M. bovis*; por lo tanto, la transmisión de humano a humano se considera rara y se limita principalmente a personas inmunodeprimidas expuestas. El desarrollo de herramientas de genotipado ha permitido identificar los grupos de transmisión que implican aislamientos con idénticas huellas dactilares, aumentando así la especificidad de identificar eventos de transmisión de persona a persona que involucren a *M. bovis*. Los pocos informes que han podido identificar tales eventos investigan clusters que comprenden un pequeño número de casos con estrechas relaciones epidemiológicas. Los resultados de uno de estos estudios indicaron que dos hermanos participaron en un evento de transmisión: sólo el hermano había sido

expuesto a ganado, mientras que la hermana no lo había hecho. Aunque, el estado inmunosuprimido de la hermana (embarazada y diabética) pudo haber facilitado el evento (Pérez-Lago, Navarro & García-de-Viedma, 2014). Así mismo, se han informado casos de transmisión de *M. bovis* de persona a persona en presencia de inmunosupresores por VIH. (Sunder et al., 2009; Stone et al., 2012; Navarro et al., 2014). No obstante, también han sido reportados eventos de novo en persona inmunocompetentes, con familiares (padre e hija) y enlaces zoonóticos en sólo un caso, pero no en el otro. Uno de estos dos eventos correspondía a la transmisión de una cepa multirresistente (MDR). La transmisión de persona a persona también se consideró responsable de la portación de un genotipo africano en una familia de Chad que vivía en Francia (Pérez-Lago et al., 2014)

De todas las micobacterias que causan tuberculosis, *M. bovis* es especialmente preocupante debido a su resistencia a la pirazinamida, un antibiótico de primera línea usado para el tratamiento en personas. Se cree, que esto ha propiciado la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. También se asocia frecuentemente con la infección por VIH. Desafortunadamente, los casos de TB por *M. bovis* son insuficientemente informados, por lo que es difícil cuantificar su prevalencia real. Según el Servicio Nacional de Genotipificación de TB de los CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades), el porcentaje de todas las infecciones de TB en los Estados Unidos atribuido a *M. bovis* es de 1-2% (Han et al., 2015).

En los países industrializados con programas de control, sólo una pequeña proporción (0.2 al 7.2%) de los casos confirmados por cultivos de la TB humana es causada por *M. bovis* (Stone, Brown & Drobniowski, 2012; Navarro et al., 2014), pero en los países no industrializados sigue siendo una importante causa de enfermedad (Michel, Müller & van Helden, 2010; Stone et al., 2012). En México se ha estimado un porcentaje de tuberculosis en humanos del 13.8% causada por *M. bovis* (Pérez-Lago et al., 2014). Esto tiene implicaciones importantes para la salud pública (Cousins, 2001; Une & Mori, 2007; Naranjo et al., 2008; Humblet et al., 2009; Michel et al., 2010).

La transmisión zoonótica de *M. bovis* ocurre a través del contacto con animales infectados o consumo de productos animales contaminados, como leche sin pasteurizar y sus derivados (Rivera et al., 2009; Stone et al., 2012; Navarro et al., 2014). La introducción de pasteurización de la leche en 1940 se postuló como explicación de una fuerte aceleración en el descenso de la tuberculosis. El papel de la ingestión de carne contaminada nunca ha sido dilucidado sistemáticamente, a pesar de que se ha incluido como un elemento de los programas de control de la enfermedad (Enarson et al., 2009).

Un estudio de 315 infecciones de *M. bovis* demostró que el 49% de los pacientes habían consumido productos lácteos no pasteurizados y el 37% tenían exposición física directa al ganado. El CDC estima que el 20% de la leche mexicana no es pasteurizada y está fácilmente disponible en forma de quesos blandos en algunas comunidades de los Estados Unidos (Han et al., 2015).

En el año de 1993, el gobierno mexicano estableció un programa de erradicación de la TB como resultado del interés particular de Estados Unidos, su principal socio comercial, que declaraba la reemergencia de la enfermedad en su territorio debida, entre otros factores, a la importación de animales infectados desde México. Dicho programa dio origen a la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 y expedida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, cuya finalidad fue la de “fomentar la producción pecuaria, la prevención, control y erradicación de las plagas y enfermedades, que, como la tuberculosis, afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos, y que, además, es una de las zoonosis más importantes” (López et al., 2007).

2.5 Patogenia producida por *Mycobacterium bovis*

Factores de manejo, edad y nutrición son determinantes en la vía de infección, así como en el periodo de incubación, proceso de la enfermedad y la diseminación. A partir de la entrada los bacilos se localizan en el complejo primario

de ganglios linfáticos regionales, luego se diseminan por vía linfática a la cadena ganglionar. Posteriormente la diseminación se da por vía hematógena en exudados y secreciones de órganos infectados. La eliminación de *M. bovis* por los animales infectados es intermitente y no está relacionado con el grado de infección del animal. Se ha comprobado que los animales recientemente infectados eliminan el microorganismo en etapas tempranas de la enfermedad, cuando aún no son detectados por las pruebas de diagnóstico (Bernardelli, 2007).

Los signos clínicos de la enfermedad son poco manifiestos en los bovinos, pero en algunos animales pueden presentarse. La vía de ingreso de *M. bovis* y la localización de la lesión están íntimamente relacionadas. Los hallazgos de las lesiones tuberculosas al examen post mortem, está en relación con el grado de afección del órgano u órganos donde se observan granulomas tuberculosos; las lesiones macroscópicas más importantes son las adenopatías, especialmente los mediastínicos y los bronquiales, luego figuran las lesiones del parénquima pulmonar que son de carácter nodular y de tamaño variado, algunos con núcleo purulento y otros con núcleo caseoso. En el pulmón, a veces histológicamente las lesiones muestran características granulomatosas, con componentes celulares de un núcleo purulento o caseoso, rodeado de células multinucleadas, y más a la periferia presencia de fibroblastos; al someterse estos a la coloración ácido resistente, los bacilos se muestran de color violáceo (Viena-Niero et al., 2006).

Las lesiones pueden localizarse en ganglios linfáticos y en diferentes órganos, en forma de granuloma o tubérculo de material purulento-caseoso de color amarillento cuyo tamaño y cantidad varían. Las lesiones histológicamente se diferencian de la respuesta inflamatoria aguda clásica, porque la población de células que la infiltra es mayoritariamente mononuclear (macrófagos y linfocitos), aunque en las etapas tempranas se observa acumulación transitoria de neutrófilos. (Thoen, Lobue & de Kantor, 2006).

2.6 Transmisión de la tuberculosis bovina entre el ganado

Existen diversas vías de transmisión de la infección por *M. bovis*, pero las principales son la respiratoria y gastrointestinal. Los estudios experimentales que involucran la exposición de los animales a *M. bovis* a través de diferentes rutas (intratraqueal, oral, intravenosa, intraperitoneal) han demostrado que la naturaleza y el alcance de las lesiones tuberculosas varían con la vía de exposición (Francis, 1971) y la ubicación de las lesiones tuberculosas afecta la forma en que *M. bovis* se elimina del huésped infectado. Estos incluyen las lesiones del sistema respiratorio, riñones, glándulas mamarias y el sistema gastrointestinal. Externamente drenan abscesos cutáneos, los cuales también pueden ser una fuente de infección en una amplia variedad de mamíferos domésticos y salvajes (Palmer, Waters & Whipple, 2003).

Del 80% al 90% de los casos la transmisión ocurre vía aerógena; con la tos o espiración de un animal infectado se expelen gran cantidad de microgotas que contienen la bacteria, las cuales al ser inhaladas por otro bovino llegan al sistema respiratorio dando comienzo a una nueva infección. Esto se ve favorecido por contacto directo de los bovinos en pastoreo, comederos, corrales y salas de ordeño (Aagaard et al., 2006).

La transmisión vertical (congénita) de *M. bovis* puede ocurrir a través de los vasos umbilicales. Los terneros probablemente son congénitamente infectados si las lesiones se limitan al sistema porta-hepático. Sin embargo, sólo aproximadamente el 1% de los terneros nacidos de vacas tuberculosas han sido congénitamente infectado con *M. bovis* (Phillips et al., 2003; Humblet, Boschioli & Saegerman, 2009).

La transmisión pseudo-vertical más probable es por la ingestión de leche contaminada con tuberculosis (Phillips et al., 2003; Humblet et al., 2009), una vaca con enfermedad subclínica suele excretar 10^3 UFC/ml. Así como por el contacto con orina, heces, saliva y secreciones nasales. Se ha encontrado que *M. bovis* sigue

siendo viable durante aproximadamente 6 meses en el suelo, esto es posible tal vez por la temperatura y humedad de este (Phillips et al., 2003).

2.7 Control y erradicación de la tuberculosis bovina

El control de la BTB está basado en un diagnóstico oportuno y la eliminación de los animales infectados, junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los rebaños. Entre las principales herramientas que se proyectan como desafíos para los programas de control, se encuentra el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de la infección en las poblaciones y la aplicación de técnicas de genotipificación para la investigación epidemiológica de los aislados (Abalos & Retamal, 2004). En la actualidad existen algunos candidatos vacunales en etapas de preclínica avanzada o en ensayo clínico, con el objetivo de desarrollar una vacuna que pueda reemplazar a la cepa vacunal de *M. bovis* BCG. Otra de las estrategias más ampliamente utilizada para desarrollar una vacuna consiste en el desarrollo de antígenos de BCG recombinantes, dentro de las cuales se encuentra la vacuna de BCG recombinante (rBCG30). Por otro lado, también se trabaja en las estrategias basadas en vacunas vivas a partir de la atenuación de *Mycobacterium*, donde se ha demostrado, entre otros resultados, la no expresión de genes de TB, disminuyendo los niveles de virulencia e incrementando la inmunogenicidad, proporcionando así una elevada protección contra la TB (Álvarez et al. 2009). De obtenerse una vacuna efectiva, es probable que su aplicación constituya un complemento óptimo para el control de la enfermedad, especialmente en aquellos países que tienen casos de TB en el ganado como consecuencia de la infección en reservorios silvestres, o bien en países en desarrollo donde otras medidas de control han fracasado (Abalos & Retamal, 2004).

Un enfoque epistémico al control de la enfermedad implica el desarrollo de una comprensión no sólo de los atributos individuales que conducen a la persistencia de la infección, sino cómo estos factores están relacionados entre sí, y la forma de como cualquier elemento influye sobre los demás, y cómo estas

interrelaciones pueden ser aplicadas para controlar una enfermedad (Figura 2), (O'Connor, Haydon & Kao, 2012).

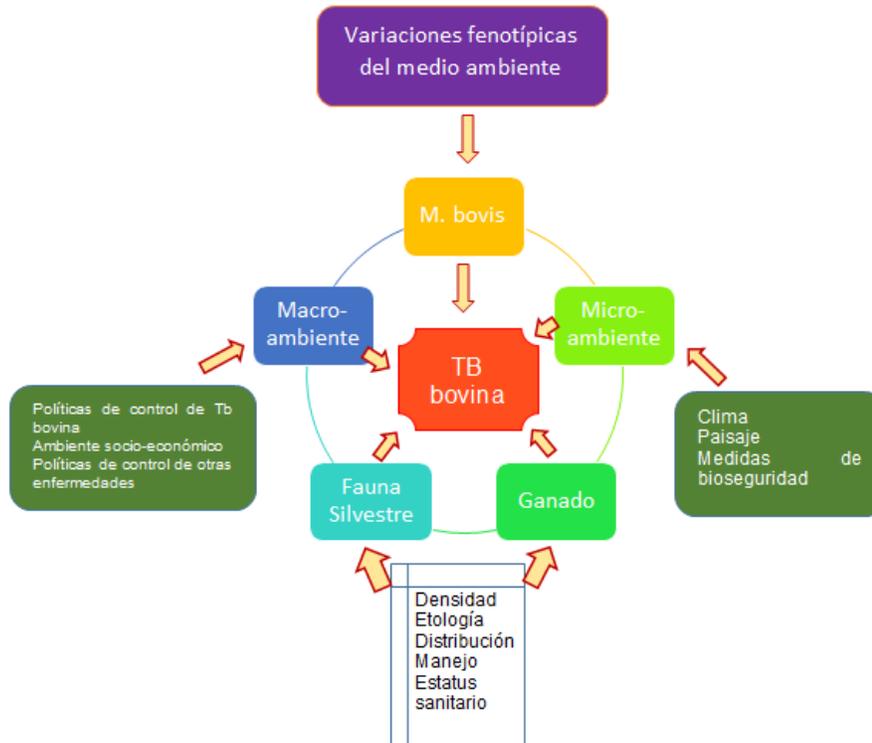


Figura 2. Factores relacionados con el control de BTB.

La erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar que la población humana esté en riesgo de contraerla, mejorar la productividad de los bovinos y así, evitar pérdidas económicas y restricciones a la movilización de los animales, tanto nacional como internacional. Para ello, se aplican estrategias de difusión y promoción de las actividades de la campaña; capacitación del personal involucrado en estas actividades, diagnóstico de campo, aplicación de cuarentenas en hatos infectados, eliminación e indemnización de los animales reactivos a las pruebas diagnósticas, inspección en rastros para confirmar y detectar nuevos casos, control de la movilización, reconocimiento y protección de regiones de baja prevalencia, certificación de hatos libres de la enfermedad y seguimiento epidemiológico (Milián-Suazo et al., 2000).

Las pruebas y eliminación universales de ganado son cruciales para erradicar la TB bovina. Desafortunadamente, este método es inhibitorio de costos en muchas áreas. Por ejemplo, se estima que cada año se sacrifican 30 000 bovinos en el Reino Unido, donde la TB bovina ha experimentado un fuerte resurgimiento debido a los vectores animales. Además, se ha realizado una investigación sobre la administración de la vacuna BCG al ganado vacuno y otros vectores de enfermedades, aunque esto no se ha generalizado, en gran parte debido al costo (Shu et al., 2014; Han et al., 2015).

2.8 Diagnóstico de la tuberculosis bovina

La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de tuberculosis alrededor del mundo. El diagnóstico clínico de la BTB es difícil emitirlo debido a la falta de signos visibles en la mayoría de los casos, sólo en un número muy pequeño de éstos es posible observar animales con enflaquecimiento progresivo, pelaje áspero y seco, diarrea intermitente y lesiones pulmonares. Aún en estos casos es fácil confundir esta enfermedad con otros que presentan un cuadro clínico similar (Rivera et al., 2009). La infección se diagnostica por lo general en el animal vivo, mediante reacciones de hipersensibilidad retardada (Thoen & Ebel, 2006).

2.8.1 Diagnóstico ante-mortem

La tuberculinización es la prueba *ante-mortem* autorizada por la Organización Mundial en Sanidad Animal (OIE). Con esta prueba se detecta la reacción de hipersensibilidad retardada mediada por células (tipo IV), mediante la inyección de un PPD (Derivado Proteico Purificado, por sus siglas en inglés) intradérmico. En los casos de reacción positiva a la inyección de PPD, como consecuencia de la reacción celular en el lugar de la inyección hay acumulación de linfocitos T, macrófagos, secreción de citocinas y otras sustancias, esta se produce dentro de un periodo de 24-72 horas post inyección y macroscópicamente se manifiesta con inflamación circunscrita, vasodilatación con permeabilidad vascular incrementada, rubor, sensibilidad a la presión, e induración tisular que en algunas

circunstancias involucra los nódulos regionales. En casos de reacciones intensas puede haber necrosis en el foco de inyección (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Existen tres formatos de esta prueba; caudal, cervical simple y comparativa. Las pruebas del pliegue caudal (PAC) se realiza en el pliegue ano-caudal interno a unos seis cm de la base de la cola y en el centro del pliegue. Esta zona es menos sensible a la tuberculina que la piel del cuello. Se inyectan 0.1 ml de PPD bovino de un miligramo por mililitro (Thoer & Kantor, 2000). En esta prueba, cualquier induración o aumento de tamaño en la zona de aplicación 72± 6 horas después de la inyección es considerado una respuesta positiva. Los datos de estudios internacionales indican que la PAC tiene una sensibilidad de 68.0-96.8% y una especificidad de 96.0-98.8% (Vordermeier, Whelan & Hewinson, 2008).

En la prueba cervical simple el lugar de inoculación es el tercio medio del cuello. Esta zona se debe depilar y limpiar muy bien. Se mide con el cutímetro y se inyectan 0.1 ml de tuberculina PPD bovino de un miligramo por mililitro (de Kantor & Ritacco, 2006). Una induración ≥ 3 mm 72± 6 horas después de la inyección es considerada positiva. La PCS tiene una sensibilidad de 80-91% y una especificidad de 75.5-96.8% (Vordermeier et al., 2008).

La prueba intradérmica comparativa se utiliza para la realización de un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *M. bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina por exposiciones a otras micobacterias. Este tipo de sensibilización puede ser atribuido a la gran reactividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias ambientales y otros géneros afines. Esta prueba consiste en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos del cuello y en la subsiguiente evaluación de la respuesta transcurrida 3 días después. Para esta prueba comparativa la dosis de tuberculina no debe ser inferior a 2.000 UI de tuberculina bovina, ni de 2.00 UI de tuberculina aviar. La distancia entre ambas inyecciones debe ser aproximadamente entre 12 a 15 cm (Lobue, 2003). La interpretación de los resultados de la prueba se realiza de la siguiente manera:

- Positivo: 4 mm mayor que la tuberculina aviar.
- Dudoso: entre 1 y 4 mm mayor que la tuberculina aviar.
- Negativo: cuando no hay reacción o cuando la reacción es igual o menor que la tuberculina aviar.

La PCC tiene una sensibilidad de 55.1-93.5% y una especificidad de 88.8-100% (Vordermeier et al., 2008).

La tuberculinización es una prueba que no garantiza un 100% de sensibilidad, es decir no detecta todos los animales infectados y tampoco es 100% específica, porque no detecta a todos los animales sin infección real. Existen animales que son positivos a la prueba, pero no están infectados o enfermos con *M. bovis*, es decir son falsos positivos; otros son negativos a la prueba estando infectados o enfermos (falsos negativos). Esto origina que un cierto número de animales infectados o enfermos queden en el rebaño sin ser detectados. Esta situación es un gravísimo inconveniente para la erradicación de la tuberculosis bovina, pues los animales enfermos no identificados por la prueba se constituirán como fuentes de infección de los casos no infectados, este hecho se observa especialmente en los animales anérgicos como consecuencia de enfermedades inmunodepresoras, gestación, tuberculosis avanzada, tratamientos con corticoides, animales débiles, animales muy viejos o animales recientemente infectados que no responden a la prueba (Thoer & Kantor, 2000).

Por otra parte, la prueba del interferón gamma (IFN- γ), es una prueba sanguínea *in vitro* desarrollada en Australia a finales de los años 80's para el diagnóstico de la BTB (Wood & Jones, 2001; de la Rúa-Domenech et al., 2006). La sensibilidad de la prueba, estimada en estudios internacionales, es de 73-100% con un valor medio de 87,6% y la especificidad es de 85,0-99,6% con un valor medio de 96,6% (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Este método se caracteriza por su rapidez, sensibilidad y sencillez (Wood & Jones, 2001).

En la actualidad la prueba de IFN- γ esta oficializada como prueba complementaria o confirmatoria en la mayoría de los países de la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, Irlanda, EEUU, Costa Rica, y en Argentina; también es aceptada por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, 2004). La prueba del IFN- γ posee una serie de ventajas adicionales para el diagnóstico de tuberculosis bovina: a) Se manipulan los animales una sola vez. b) Se puede repetir la prueba tantas veces cuando sea necesaria. c) La prueba es comparativa y excluye aquellos animales que puedan reaccionar por infecciones con micobacterias atípicas no patógenas. d) El plasma obtenido del animal para el diagnóstico de tuberculosis bovina puede ser utilizado para el diagnóstico de otras enfermedades como Leptospirosis, Brucelosis, etc. Las desventajas son: la prueba es relativamente cara y se necesita un laboratorio y personas capacitadas para procesar las muestras (Wood & Jones, 2001).

2.8.2 Diagnóstico post-mortem

El diagnóstico en hatos primo-infectados se hace por la caracterización macro y microscópica de las lesiones de los animales muertos en el hato o remitidos al rastro, seguido de aislamiento y tipificación en el laboratorio (Viena-Niero et al., 2006).

Las lesiones granulomatosas pueden variar dependiendo de la localización anatómica y la forma de diseminación, es posible encontrar:

- a) En los pulmones áreas de tamaño considerable con apariencia caseificada y zonas de mineralización.
- b) En la superficie serosa incluyendo las capsulas de los órganos se observan nódulos firmes de superficie lisa, Varía de dos a 10 cm de diámetro. También pueden presentarse zonas caseificadas en las áreas profundas (tuberculosis perlada).
- c) Nódulos firmes de aspecto granulomatoso con áreas de calcificación y caseificación en ganglios linfáticos y órganos parenquimatosos como el hígado y el riñón.
- d) Exudado de apariencia purulenta en meninges.
- e) Focos muy pequeños menores de 1cm de diámetro en cualquier órgano, conocida como tuberculosis miliar (Retamal & Abalos, 2003).

En la evaluación histológica se puede detectar bacilos ácido alcohol resistentes libres en el citoplasma de los macrófagos, histiocitos y células gigantes de la lesión granulomatosa (Hines et al., 2006).

2.8.2.1 Cultivo y aislamiento bacteriano

El cultivo bacteriológico es el método que tiene más sensibilidad (70-90%) de los que se conocen en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias en una muestra determinada, ya que basta que existan más de 10 bacilos / ml para que sea positivo (Nava et al., 2005). Los medios de cultivo primarios de las micobacterias incluyen un medio selectivo y otro no selectivo. Los medios selectivos contienen antibióticos para evitar el sobre-crecimiento de bacterias y hongos contaminantes. Hay tres formulaciones generales que se usan tanto en los medios selectivos como no selectivos. Estos medios son el agar semi-sintético como el Middlebrook 7H10 y 7H11, los medios sólidos a base de huevo coagulado, como el de Löwenstein-Jensen y los medios de caldo como el Middlebrook 7H9 y 7H12 (Jawest et al., 1996)

Las micobacterias requieren medios enriquecidos para crecer, los medios usados tradicionalmente son: Stonebrink y Lowenstein-Jensen ya que presentan una menor tasa de contaminación, aunque su rendimiento no siempre sea óptimo. Los medios Middlebrook 7H10 o 7H11 muestran una tasa de crecimiento más rápida, de 28 días, a diferencia de los 36 días con medio Stonebrink; sin embargo, estos medios son más susceptibles al crecimiento de microorganismos contaminantes (Hines et al., 2006). El intervalo generacional de *M. bovis* es de 16-20 horas, por lo que los cultivos se deben incubar hasta por 8 semanas (de preferencia 10 - 12 semanas) a 37°C en una atmosfera enriquecida con CO₂ al 5% (Corner, 1994).

Para el aislamiento y cultivo de *Mycobacterium*, existe un requisito inherente, urgente y vital para la detección correcta y temprana del patógeno. Gran parte del esfuerzo se ve obstaculizado por la presencia de diferentes bacterias y hongos en las muestras remitidas a laboratorio. Esto da como resultado un retraso en la

confirmación del microorganismo causal, indicando una necesidad apremiante de establecer un método económico de descontaminación. La descontaminación con ácidos, álcalis o incluso detergentes es una práctica común ya que las micobacterias son resistentes a tales agentes. Como resultado las muestras se procesan por varios métodos que se han practicado durante muchos años. Ciertos agentes descontaminantes destruyen un número sustancial de micobacterias junto con los contaminantes, mientras que otros son demasiado débiles para destruirlos. La consecuencia resultante es un retraso costoso en la detección de los bacilos de la tuberculosis (Chatterjee et al., 2013)

2.9 Dormancia y latencia de *Mycobacterium bovis*

La dormancia puede ser definida como el estado reversible del apagado metabólico de la bacteria. El término "bacterias dormantes" se refiere a un estado donde las bacterias con actividad metabólica baja permanecen viables, aunque no forman colonias directamente o inmediatamente en medio sólido, pero pueden ser resucitados para formar colonias en la placa en condiciones apropiadas. Las características importantes de dichas bacterias inactivas incluyen la incapacidad para crecer directamente sobre las placas y la resistencia a diversas tensiones y agentes antimicrobianos (Zhang, 2004).

El desplazamiento de estado de replicación activa al estado de no replicación o dormancia es una estrategia de muchas bacterias para superar condiciones ambientales desfavorables, al entrar en un estado reversible de baja actividad metabólica. Muchos microorganismos son capaces de resistir los factores estresantes tales como la temperatura, la desecación y los antibióticos entrando en estado de dormancia (Jones & Lennon, 2010; Magomedze & Mulder, 2012; Singh, Saraav & Sharma, 2014; Chisholm & Tanaka, 2016). Las condiciones responsables de la inactividad son ausencia de nutrientes esenciales, hipoxia y respiración de gases de inhibición, tales como el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) que conducen a la detención del crecimiento en fase estacionaria, esto se acompaña por la expresión de varios genes asociados a latencia (Singh et al., 2014). El término latencia se refiere a la situación *in vivo* en la que las bacterias y el

huésped han establecido un estado de equilibrio, sin causar síntomas aparentes en el huésped o la presencia de cualquier lesión que no produce los síntomas de su existencia (Zhang, 2004; Álvarez et al., 2009; Magomedze & Mulder, 2012). El cambio a un estado latente puede ocurrir después de la infección inicial (persistencia anterior a los antibióticos) o después de la finalización del tratamiento de la tuberculosis en pacientes que desarrollaron reactivación tardía (persistencia post-antibiótico). La existencia de la TB latente fue reconocida originalmente como TB no cultivable dentro de las lesiones pulmonares cerradas (Velayati et al., 2016). En la infección latente, los bacilos se replican típicamente dentro de los macrófagos hasta que una respuesta inmune efectiva se desencadena y los bacilos se restringen a las lesiones tuberculosas, frenando el progreso de la enfermedad (Velayati, Farnia & Masjedi, 2012).

La capacidad que posee *Mycobacterium* para sobrevivir dentro de las células es el resultado de un complejo y exquisito control de su regulación genética. La expresión diferencial de algunos genes regulatorios puede ser determinante en la infección por el patógeno o para su capacidad de persistir dentro del hospedero. Existe correlación entre los diferentes reguladores transcripcionales y la diversidad de condiciones ambientales que pueden originar un estrés celular. Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la micobacteria persiste en presencia de diferentes situaciones de estrés (cambios bruscos de temperatura, hipoxia, ausencia de hierro o zinc, presencia de óxido nítrico y estrés oxidativo) (Álvarez et al., 2009; Singh et al., 2014).

En los modelos animales de experimentación, una de las técnicas desarrolladas para estudiar la expresión de estos genes ha sido la formación de granulomas artificiales, tejido donde se pueden medir los niveles de expresión en los diferentes intervalos de tiempo. Los estudios de la expresión genética permiten la identificación de los genes involucrados en la adaptación de *Mycobacterium* al ambiente del pulmón durante la infección (Álvarez et al., 2009).

3. Reactivación celular

La identificación de la latencia bacteriana y reanimación se revolucionó cuando el papel de los factores promotores de resucitación (Rpf por sus siglas en inglés) de *M. luteus* fue revelado por Mukamolova et al., (1998). Los estudios sobre la recuperación de la bacteria *M. luteus* de una fase no replicante condujeron al descubrimiento de los Rpf que pueden promover la recuperación de bacterias latentes. Los primeros estudios demostraron que el sobrenadante del medio agotado de cultivos de *M. luteus* aumentó el número de células viables recuperadas de los cultivos latentes de *M. luteus*. El factor de resucitación se secreta en el medio de cultivo cuando la bacteria de *M. luteus* entra en fase estacionaria. El gen que codifica el Rpf de *M. luteus* fue clonado y expresado en *E. coli*. La adición de Rpf purificado a medio líquido a concentraciones picomolares aumentó grandemente el número de células viables que podrían ser recuperadas de cultivos en fase estacionaria y acortó el intervalo de la fase de latencia. El Rpf purificado de *M. luteus* también puede acortar la fase estacionaria y aumentar la recuperación de *M. tuberculosis*, *M. avium* y otras micobacterias a partir de cultivos en fase estacionaria prolongada. Interesantemente, el Rpf de *M. luteus* comparte homología con varios marcos de lectura abiertos (ORF) de las micobacterias (Zhu et al., 2003).

M. tuberculosis junto con *M. bovis* (BCG) contiene cinco genes Rpf similares, designados *RpfA* al *RpfE*, los Rpf promueven la replicación y la regeneración de las células micobacterianas (Cuadro 1), (Mukamolova et al., 2002b; Downing et al., 2004; Ravagnani et al., 2005; Ruggiero et al., 2007; Hett et al., 2007; Kana & Mizrahi, 2010). *RpfB*, uno de los cinco Rpf secretados por los bacilos de la tuberculosis, tiene un papel crucial en la reanimación y el crecimiento de la estimulación de *M. tuberculosis* latente. Es probable que este dominio tenga características biológicas y la inmunogenicidad similares a la de los Rpf de longitud completa. Los estudios muestran que *RpfB* es el candidato más prometedor de las cinco proteínas Rpf, en cuanto a su inmunogenicidad y eficacia protectora y estas características se proponen como una vacuna de subunidad novedosa para la prevención de la TB (Seidi & Jahanban-Esfahlan, 2013).

Así mismo, los Rpf promueven el crecimiento de células de *M. tuberculosis* en estado no cultivable (Downing et al., 2004; Zhang, 2004; Romano et al., 2012; Wivagg & Hung, 2012). Estimulan el crecimiento de *M. tuberculosis* con baja viabilidad o en fase estacionaria por la incubación prolongada (Shleeva et al., 2002; Romano et al., 2012). Se encontró que estos se requieren para mantener la integridad de la membrana externa, ya que su delección da como resultado un aumento de la permeabilidad de la membrana exterior (Wivagg & Hung, 2012).

Las bases de datos de secuencias de DNA contienen más de 30 miembros de la familia de genes Rpf y la mayoría de los organismos contienen varios representantes (Mukamolova et al., 2002b).

Cuadro 1. Genes que codifican proteínas que contienen un dominio de Rpf en diferentes microorganismos (Modificado y adoptado de Ravagnani et al., 2005)

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)	No. De genes	Número de accesión del genoma
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2.5	3	NC_002935
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	3.3	2	NC_003450
<i>Corynebacterium efficiens</i>	3.1	2	NC_004369
<i>Micrococcus luteus</i>	2.3	1	Mukamolova et al., 1998
<i>Mycobacterium avium</i>	4.7	4	NC_002944
<i>Mycobacterium bovis</i>	4.3	5	NC_002945
<i>Mycobacterium leprae</i>	3.3	3	NC_002677
<i>Mycobacterium marinum</i>	6.5	4	NC_004506 (indefinido)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	7.0	4	NC_002974 (indefinido)
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	4.4	5	NC_000962
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8.7	5	NC_003888
<i>Streptomyces avermitilis</i>	9.0	6	NC_003155

3.0.1 Factor promotor de resucitación B (RpfB)

La proteína RpfB (Rv1009), es la mayor y más complejas de las cinco, estimula la resucitación de las células dormantes (Mukamolova et al., 2002b; Ruggiero et al., 2007; UniProt, 2015), y es activa a concentraciones picomolares. Aumenta el número de bacterias en cultivos de hasta tres meses de incubación. Estimula el crecimiento de la fase estacionaria de *M. bovis*. (UniProt, 2015). Por sí mismo tiene poca actividad en la pared celular, pero cuando se combina con RipA actúan como un complejo proteína-proteína sobre la degradación del peptidoglicano (Nikitushkin et al., 2015; UniProt, 2015). Tiene 1089 bp, un peso de 38078.4 Da y 362 aminoácidos (TubercuList, SA).

La proteína RpfB hidroliza el enlace beta-1,4-glicosídico entre el N-acetil ácido murámico y N- acetil glucosamina (van Asselt, Thunnissen & Dijkstra, 1999). Se cree que funciona como una endopeptidasa, capaz de hidrolizar ácido D- glutamil-meso-diaminopimélico (Boneca, 2005), dos aminoácidos que forman parte de los péptidos de reticulación vital para mantener el peptidoglicano rígido y estable (Brennan, 2003). Tanto RipA como RpfB localizan el septosoma de la bacteria en división (Hett et al., 2007) y por lo tanto pueden desempeñar un papel en las últimas etapas de la división celular de micobacterias, posiblemente durante el rebrote a partir de un estado de estrés (Hett et al., 2008).

3.0.2 Proteína de secreción (RipA)

RipA (Rv1477) es una proteína asociada a la célula, se requiere para la separación normal de las células hijas tras la división celular y la integridad de la pared celular. Es también necesaria para la invasión de la célula huésped (Gupta & Srivastava, 2012; UniProt, 2015). Tiene 1419 bp, un peso de 49808.1 Da y 472 aminoácidos (TubercuList, SA).

Como se mencionó antes RipA (proteína de interacción con RpfB) tiene interacción sinérgica con la proteína RpfB (Hett et al., 2007). RipA tiene actividad hidrolítica contra varios sustratos de la pared celular. Ambas proteínas son capaces de localizar el septum celular durante el crecimiento de la micobacteria (Hett, 2007;

Hett, Chao, Deng & Rubin, 2008). Sus cualidades de alteración de las propiedades mecánicas de la pared celular, desconexión celular de las bacterias en crecimiento activo, así como la liberación de peptidoglicanos solubles, hacen a RipA un excelente candidato como diana terapéutica contra la tuberculosis (Hett et al., 2008; Ruggiero et al., 2010).

La formación del complejo RpfB-RipA genera un aumento en la hidrólisis de la pared celular, lo que sugiere que la regulación del proceso de hidrólisis, se realiza mediante interacciones proteína-proteína. Sin embargo, el mecanismo que regula esta interacción y coordina la hidrólisis con la síntesis de pared celular, es desconocido (Hett et al., 2008; Hett et al., 2010).

Por lo tanto, la familia de factores promotores de crecimiento de bacterias, pueden proporcionar nuevas oportunidades para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis bovina y dado que la tuberculosis bovina sigue siendo un problema de salud animal importante, nuevas herramientas para el control de la enfermedad en la vida silvestre y / o ganado doméstico, como las vacunas y pruebas de diagnóstico mejoradas, se necesitan urgentemente.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia y eficacia de las proteínas RpfB y RipA en la resucitación de *Mycobacterium bovis* en cultivos líquidos y sólidos

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la curva de crecimiento de *M. bovis* en medio Sauton
- Inducir cultivos celulares de *M. bovis* a células no cultivables
- Resucitar células no cultivables con cuatro concentraciones diferentes de las proteínas RpfB y RipA en medios líquidos y sólidos
- Evaluar la mejor concentración de las proteínas RpfB y RipA en la resucitación de *M. bovis*

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de medios de cultivo enriquecidos

4.1.1 Middlebrook 7H9 + OADC + Tween 80 al 20%:

Se prepararon cuatro matraces con 30 ml de medio cada uno, conteniendo 0.14g del medio de base Middlebrook 7H9 (Difco™) en 27 ml de agua destilada y 0.075 ml de Tween 80 al 20% (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), se colocó en un matraz (previamente lavado con tapón de gasa y algodón y cubierta de papel aluminio) y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Ya esterilizado se dejó enfriar a 50-55 °C y en campana de flujo laminar se le adicionaron 3 ml de OADC (BD BBL enriquecimiento para Middlebrook), previamente esterilizado por filtro de jeringa (membrana de acetato celulosa Thermo, 25 mm, 0.2µm). El medio se dejó incubando a 37 °C durante 48 horas para verificar la esterilidad del medio. Pasado ese tiempo se procedió a realizar el cultivo de las colonias de la cepa de *Mycobacterium bovis* AN5, estos se incubaron por cuatro semanas a 37 °C. Todos los procedimientos se realizaron por duplicado.

4.1.2 Middlebrook 7H10 + OADC:

Se prepararon 100 ml de medio conteniendo 2.1g del medio de base Middlebrook 7H10 (Difco™) en 90 ml de agua destilada y se colocaron en un matraz previamente lavado (con tapón de gasa y algodón y cubierta de papel aluminio) y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Ya esterilizado se dejó enfriar a 50-55 °C y en campana de flujo laminar se le adicionaron 10 ml de OADC, previamente esterilizada por filtro de jeringa de 0.2µm. Se procedió a colocar de 30-35 ml del medio en cajas de Petri estériles esperando a que se solidificaran, posteriormente se dejaron incubando a 37 °C por 48 horas para verificar la esterilidad del medio, almacenándose hasta su uso.

4.2 Preparación de inóculos de bacterias activas

Después de las ocho semanas de crecimiento de la cepa de *Mycobacterium bovis* AN5, en medio 7H9, los cultivos se transfirieron a tubos estériles de 50 ml,

para su centrifugación a 2 500 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante; la pastilla bacteriana se resuspendió en 15 ml de medio 7H9 y se pasó a través de una aguja 22G x 32 mm, con la finalidad de que las bacterias se separaran; finalmente se transfirió 1 ml de la suspensión bacteriana a tubos de 1.5 ml estériles con glicerol al 20%, estos se almacenaron a -80 °C para su conservación.

4.3 Determinación de unidades formadoras de colonia (UFC):

La determinación de UFC se realizó con los inóculos de la cepa de *M. bovis* previamente preparados, estos se retiraron del ultracongelador y se incubaron a baño María a 37 °C durante 60 minutos, posteriormente se transfirieron 500µl del inóculo a tubos con 450µl de PBS 1x estéril y se pasó la suspensión por una jeringa con aguja 27G x 13mm para dispersar las bacterias; se tomaron 50 µl de la suspensión y se transfirieron a tubos con 450µl de PBS 1x estéril, repitiendo esta serie de diluciones por ocho tubos, de cada dilución obtenida se sembraron 100µl en placas del medio 7H10 (por duplicado). Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C hasta observar crecimiento (4 semanas). Finalmente se contó el número de colonias por placa. Se determinó el resultado de las UFC mediante el conteo del número de colonias multiplicado por el factor de dilución.

4.4 Crecimiento de *M. bovis* para obtención de células activas

La obtención de bacterias fue de medio sólido Stonebrink después de cuatro semanas de cultivo. Posteriormente, estas se pasaron a medio Middlebrook 7H9 para hacer la obtención de los inóculos de acuerdo a lo descrito previamente.

4.5 Preparación del medio de lavado y de cultivo sin enriquecimiento para cinética bacteriana

4.5.1 Medio mínimo Sauton:

El medio mínimo Sauton como solución de lavado se preparó utilizando 2g de L-asparagina, 0.25g de sulfato de magnesio, 0.25g de fosfato dipotásico, 1g de ácido cítrico y 0.025g de citrato de amonio férrico, disueltos en 500 ml de agua destilada, el pH se ajustó a 7.2 con NaOH al 4%.

Para la preparación de medio mínimo Sauton como medio de cultivo de las colonias de la cepa *M. bovis* AN5, se utilizaron 1.08g de L-asparagina, 0.135g de sulfato de magnesio, 0.135g de fosfato dipotásico, 0.54g de ácido cítrico y 0.013g de citrato de amonio férrico, disueltos en 270 ml de agua destilada, el pH se ajustó a 7.2 con NaOH al 4%.

Los medios se esterilizaron en autoclave durante 10 min a 121 °C y se dejaron incubando a 37 °C durante 48 horas para verificar la esterilidad del medio. Pasadas las 48 horas y con medio estéril se procedió a realizar el lavado (medio Sauton como solución de lavado) de uno de los cultivos de la cepa AN5 del medio 7H9. El cultivo se dividió por decantación en 3 tubos estériles de 50 ml; posteriormente se centrifugaron a 2 500 rpm durante 15 minutos; se eliminó el sobrenadante y se agregó 10 ml del medio Sauton para lavado, la pastilla bacteriana se resuspendió por vibración mecánica en vortex y se centrifugó nuevamente a 2 500 rpm durante 15 minutos. Este procedimiento se realizó en dos ocasiones más, para un total tres pasos de lavado. Al finalizar, se colectó la pastilla bacteriana de los tres tubos con 5 ml de medio Sauton, y se vertió en los 270 ml de medio Sauton, se incubó a 37 °C durante dos semanas. Para conocer la cinética de crecimiento se midió la densidad óptica a 600nm en el espectrofotómetro cada 24 horas hasta alcanzar la fase estacionaria.

4.6 Dormancia bacteriana

Para la inducción de la dormancia se preparó una solución no enriquecida de 125 ml de medio Sauton, el cual fue inoculado con 20 ml del cultivo empleado en la determinación de la cinética bacteriana. Los cultivos fueron incubados a 37 °C sin agitación en frascos de vidrio cerrados herméticamente durante dos y cuatro meses, respectivamente. Cada cultivo se realizó por triplicado. Para evitar contaminación y la entrada de oxígeno a los medios, se prepararon cultivos para la toma de muestras en tubos con 10 ml de medio Sauton inoculados con 1 ml de medio utilizado en la cinética de crecimiento, Se hicieron tres tubos para la toma de muestras a los 15, 30, 45 y 60 días (para dos meses), 75, 90, 105 y 120 días (para cuatro meses) de

cultivo. Todos los cultivos se hicieron por triplicado; teniendo así un total de 72 tubos para muestreo de OD y posterior filtración.

4.6.1 Filtrado de los cultivos

Para el filtrado de los cultivos se utilizaron ocho sistemas de filtración por jeringa (SIGMA ALDRICH portafiltros de plástico Whatman de 47 mm). Cada filtro se esterilizó con membranas de filtro de diferente tamaño de poro de 47 mm de diámetro; se utilizaron membranas de 5 μm , 3 μm , 1.5 μm , 0.8 μm y 0.45 μm (SIGMA ALDRICH). Con el sistema estéril se procedió a hacer las filtraciones de los cultivos con ayuda de una jeringa de 20 ml, los cultivos fueron pasados primero por aguja 22G x 32 mm y agitados mecánicamente con perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (BioSpec) con la finalidad de separar los grumos bacterianos, enseguida se pasó el cultivo por el filtro de 5 μm , el filtrado se pasó posteriormente por las membranas de 3, 1.5, 0.8 y finalmente por la de 0.45 μm . Posterior a cada filtrado se tomaron 500 μl del medio para posterior utilización (300 μl almacenamiento para posterior RT-PCR, 100 μl para evaluar la viabilidad en cultivo en medio 7H10 y 100 μl para conteo microscópico).

4.6.2 Evaluación de la viabilidad celular:

Se sembraron alícuotas de 100 μl en agar 7H10 de cada filtrado obtenido en el procedimiento anterior. Las placas se incubaron a 37 °C durante dos meses.

4.6.3 Conteo microscópico:

El conteo microscópico fue mediante la cámara de Neubauer, se realizó una tinción en líquido de la alícuota de 100 μl de medio Sauton de cada día de lectura de la dormancia, la cual se tomó posterior a cada paso por las membranas de filtrado, la muestra se incubó en baño María por 30 minutos a 95 °C, posteriormente se centrifugo por 10 minutos a 10 000 rpm a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de PBS 1x estéril y se procedió a pasarse por jeringa de insulina tres veces. La muestra se volvió a centrifugar, se desechó el sobrenadante agregando 100 μl de carbolfucsina al 0.3% mezclando por inversión

para tinción completa de las células, se volvió a centrifugar la muestra, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril volviendo a centrifugar la muestra, se desechó el sobrenadante resuspendiendo en 100µl de solución para decolorar (alcohol-ácido 1%) y se centrifugó (se repitió este paso por dos ocasiones más), finalmente se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 100µl de agua destilada estéril. Se procedió a contar 10µl de la muestra en microscopio con objetivo de 100x y aceite de inmersión.

4.7 Resucitación de células

Para determinar la resucitación celular se evaluaron cuatro concentraciones de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y RipA + RpfB. Como controles se usó filtrado de cultivo (FC) de *M. bovis* AN5 y buffer de solubilización.

Cuadro 2. Concentración de proteínas recombinantes en medios 7H10 y 7H9 para el crecimiento de *M. bovis*

Tratamiento	RpfB (µg)	RipA (µg)	Concentración de proteína total (µg)
1	0	0	0
2	15	0	15
3	30	0	30
4	60	0	60
5	120	0	120
6	0	15	15
7	0	30	30
8	0	60	60
9	0	120	120
10	7.5	7.5	15
11	15	15	30
12	30	30	60
13	60	60	120
14	FC	FC	120
15	FC	FC	500

Se preparó el medio agar 7H10 de acuerdo a lo descrito anteriormente, antes de que se enfriara el medio se separó en un tubo 20 ml para cada tratamiento (por duplicado) y se agregaron los ml necesarios de proteína para cada tratamiento, se mezcló bien y se agregó en la caja de Petri, se dejó en incubación durante 24 horas

para comprobar esterilidad. Posteriormente se cultivaron las placas (2×10^5 bacterias dormantes o 4×10^4 bacterias activas). El crecimiento se evaluó durante cuatro semanas, cada cuatro días.

Se prepararon tubos con 10 ml de medio 7H9 para cada tratamiento (por duplicado), a cada tubo se le agregaron los ml necesarios de proteína. Posteriormente se cultivaron en los medios (2×10^5 bacterias dormantes o 4×10^4 bacterias activas). Se midió la DO de cada tubo cada 72 horas. A los 15 días de crecimiento se contó el número de células en cámara de Neubauer, crecimiento en placa y DO.

4.8 Controles de cultivo

Como controles (positivo y negativo) durante el crecimiento de *M. bovis*, se usó filtrado de cultivo (FC) de *M. bovis* AN5, dado que las proteínas del FC de *M. bovis* son antígenos con un alto potencial serodiagnóstico y contienen los factores promotores de resucitación y como control negativo, se utilizó buffer de solubilización para comprobar que no se estuviera alterando el crecimiento de *M. bovis*.

4.9 Análisis estadístico

Para determinar diferencia estadística entre los diferentes grupos para los diferentes tratamientos se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, a un nivel de significancia de 95 %. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 7.0.

V. RESULTADOS

5.1 Cinética de crecimiento bacteriano

Con el objetivo de determinar la cinética de crecimiento de *M. bovis* AN5 en medio mínimo, se realizó una cinética de crecimiento, la cual mostró que alcanzó su fase logarítmica intermedia de crecimiento a los ocho días de incubación y su fase estacionaria a los 14 días, manteniéndose hasta los 38 días de incubación. Posteriormente su crecimiento decreció. Con base en estos resultados, y de acuerdo a los reportes de la literatura, se estableció el tiempo para la inducción de la dormancia de *M. bovis*.

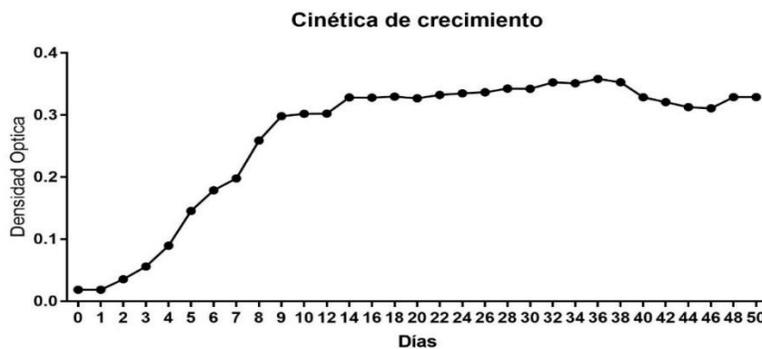


Figura 3. Cinética de crecimiento de *M. bovis* en medio Sauton.

5.2 Dormancia bacteriana

En relación a la dormancia bacteriana, en la figura 4 se observa como el crecimiento bacteriano en condiciones herméticas se mantiene sin cambios hasta los 75 días de incubación, posteriormente hay un aumento en el crecimiento bacteriano hasta los 105 días, el cual decrece a los 120 días. El aumento en la DO a los 90 y 105 días, se puede deber al resultado de un desarrollo secundario menor de células que permanecen viables en el cultivo bacteriano o de una reanimación espontánea de las células no cultivables, o por una combinación de estos dos procesos. Conforme pasa el tiempo de estimulación de la dormancia las bacterias tienen menos capacidad de generar colonias en placa.

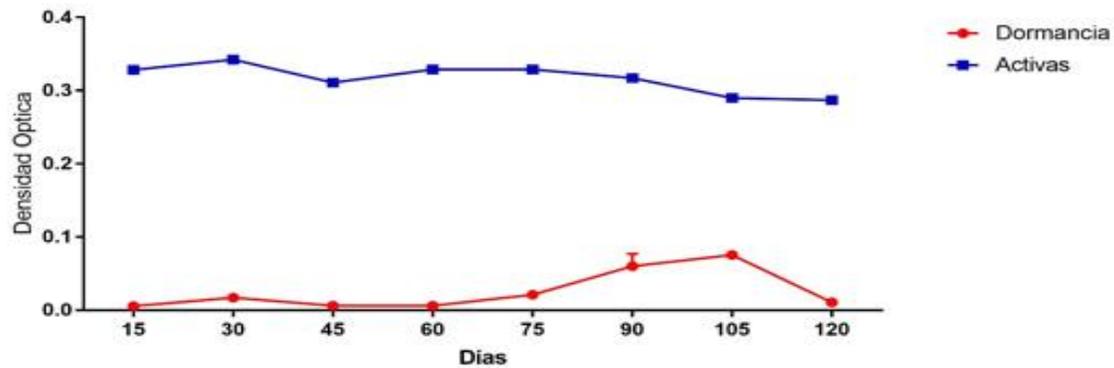


Figura 4. Densidad óptica (600 nm) y tiempo a la dormancia de *M. bovis* en medio Sauton.

5.2.1 Conteo en placa de la dormancia

En el cuadro 3 se observa el número de UFC obtenidas y el tiempo de crecimiento. La capacidad de formar UFC disminuye a los 30, 60, 90 y 105 días, de la misma forma, las células tardan más tiempo en crecer en placa. Factores que indican que las células están disminuyendo su metabolismo conforme ingresan en estado de dormancia.

Cuadro 3. Unidades formadoras de colonia por tiempo para determinar la dormancia, después de obtener el filtrado del cultivo de AN5 del medio Sauton de la membrana de 1.5 μm de cada 15 días y cultivado en medio 7H10.

Días	UFC	Día de crecimiento
15	1.2×10^2	15
30	5×10^1	25
45	8×10^1	30
60	5×10^1	60
75	2.6×10^2	45
90	4×10^1	30
105	9×10^1	46
120	2×10^1	46

5.2.2 Conteo microscópico del tiempo de dormancia bacteriana

Las células obtenidas tras la filtración con membrana de 1.5 μm , se contaron en microscopio con la cámara de Neubauer cada 15 días. La figura 5, muestra el número de células dormantes obtenidas después de la filtración por membrana de 1.5 μm .

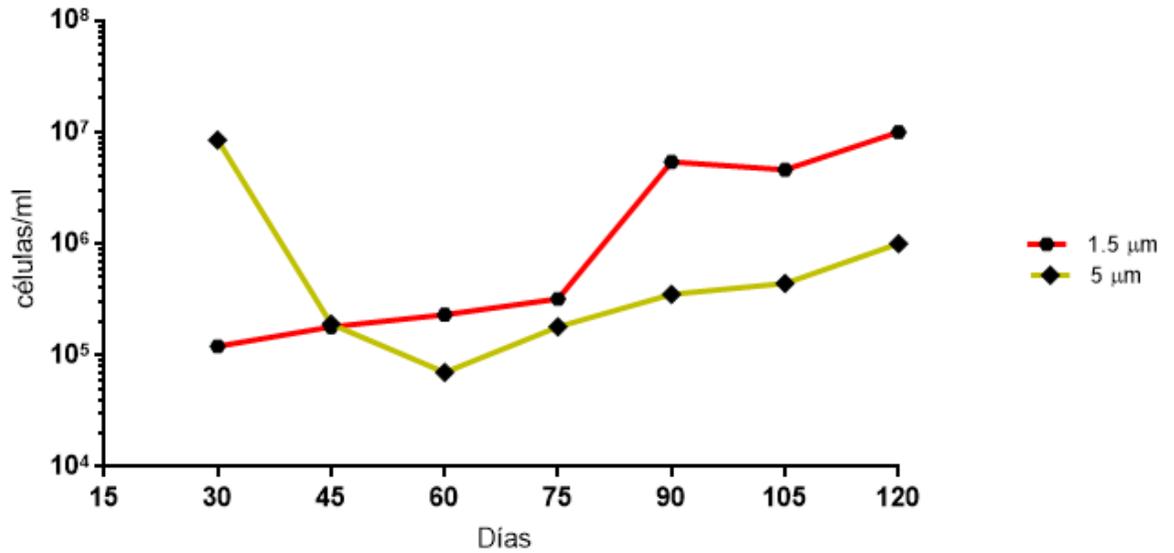


Figura 5. Conteo bacteriano en cámara de Neubauer del tiempo de dormancia en medio Sauton.

5.3 Evaluación de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y la combinación de ambas en medio Middlebrook 7H10 en el aumento (bacterias activas) y reactivación (bacterias dormantes) de *M. bovis* mediante el conteo de unidades formadoras de colonias.

5.3.1 Evaluación de RipA en el aumento de bacterias activas

En la figura 6 se muestran los resultados del crecimiento de *M. bovis* AN5 en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó desde el día 14 post-inoculación, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con el tratamiento de 15 μg , donde se observó el crecimiento de 1×10^2 UFC, mientras que con el control sin proteína sólo hubo un crecimiento de 1×10^4 UFC (ANEXO 1).

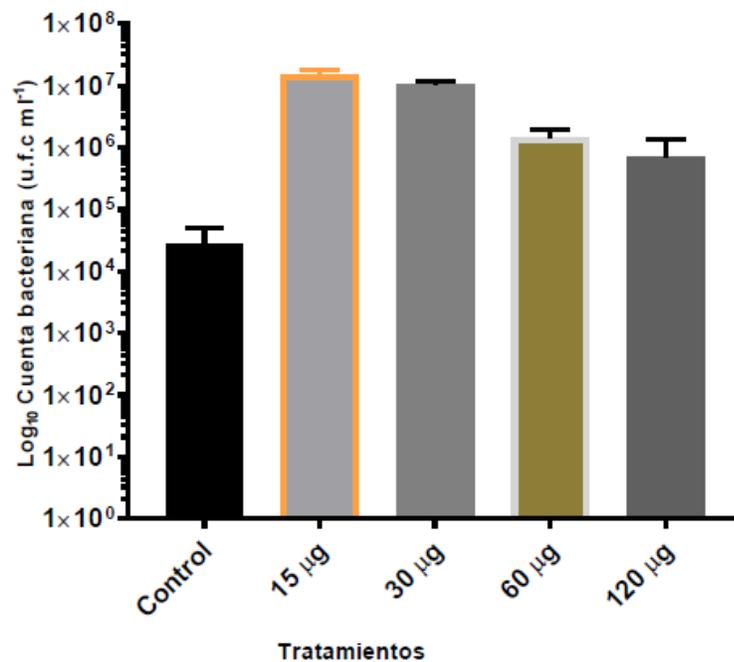


Figura 6. Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.3.2 Evaluación de RipA en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 7 se muestran los resultados de la inducción del crecimiento de *M. bovis* AN5 en estado dormante en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó a partir del día 17 post-inoculación, con los diferentes porcentajes de proteína evaluadas sin existir diferencia estadística significativa entre tratamientos. No se observó crecimiento de bacterias dormantes sin proteína recombinante (ANEXO 1).

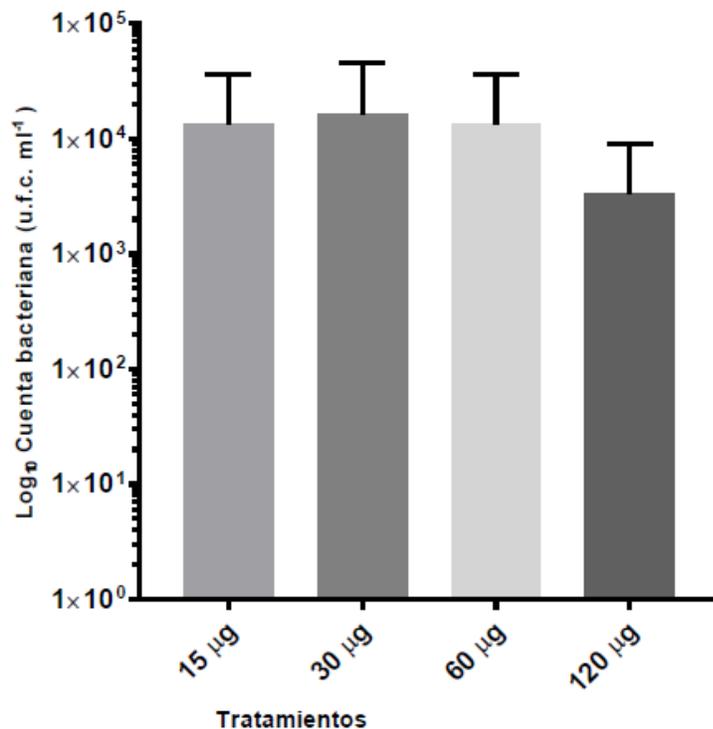


Figura 7. Efecto de la proteína recombinante RipA sobre la reactivación de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.3.3 Evaluación de RpfB en el aumento de bacterias activas

En la figura 8 se muestran los resultados del aumento del crecimiento de *M. bovis* AN5 en estado activo en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó a partir del día 9 post-inoculación, sin existir diferencia estadística significativa entre el control y las diferentes concentraciones de proteína. El tratamiento con el cual se observó mayor crecimiento bacteriano fue con el de 120 μg , donde se observaron 1×10^5 UFC (ANEXO 1).

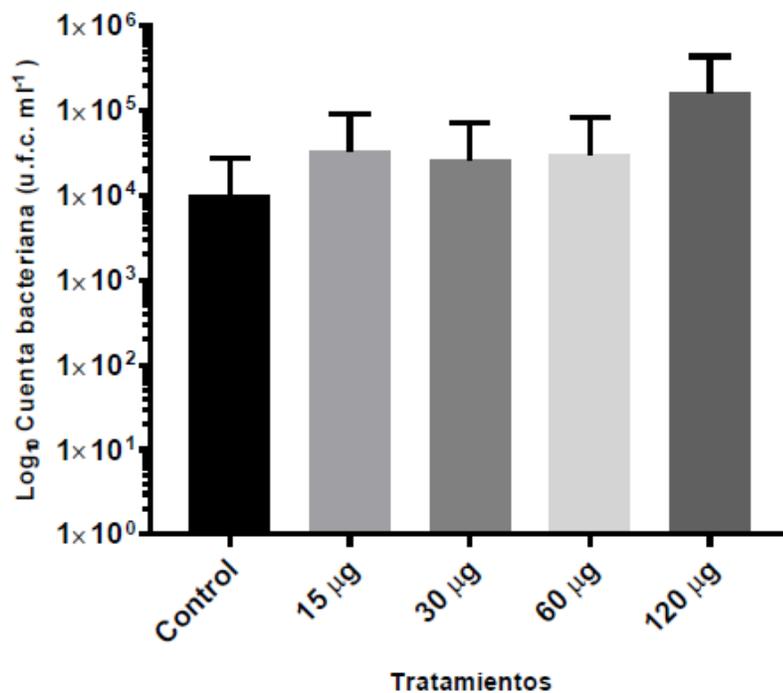


Figura 8. Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.3.4 Evaluación de RpfB en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 9 se muestran los resultados de la inducción del crecimiento de *M. bovis* AN5 en estado dormante en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó a partir del día 9 post-inoculación, sin existir diferencia estadística significativa entre diferentes concentraciones de proteína. El tratamiento donde se observó mayor crecimiento fue con el de 30 μg de proteína recombinante (ANEXO 1).

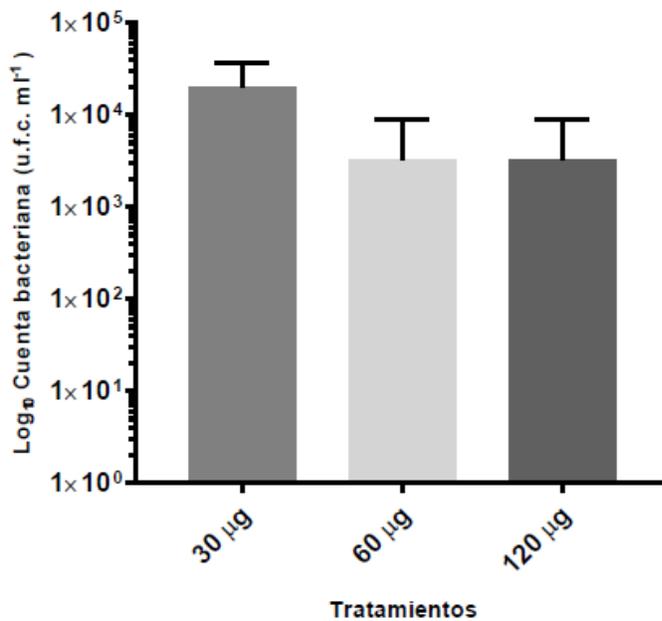


Figura 9. Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre la reactivación de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.3.5 Evaluación de RipA y RpfB en el aumento de bacterias activas

En la figura 10 se muestran los resultados del aumento del crecimiento de *M. bovis* AN5 en estado activo en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó a partir del día 2 post-inoculación, sin existir diferencia estadística significativa entre las diferentes concentraciones de proteína. Se observó crecimiento de UFC con la combinación de las proteínas recombinantes, mientras que al no emplearlas no se observa crecimiento (ANEXO 1).

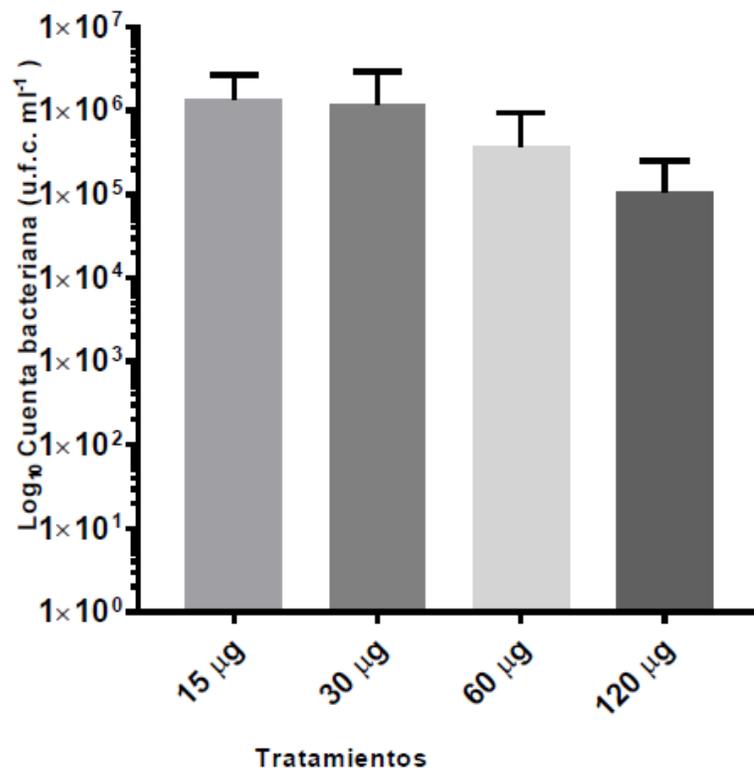


Figura 10. Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.3.6 Evaluación de RipA y RpfB en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 11 se muestran los resultados de la inducción del crecimiento de *M. bovis* AN5 en estado dormante en placa con medio Middlebrook 7H10. La aparición de múltiples colonias se observó a partir del día 2 post-inoculación, sin existir diferencia estadística significativa entre las diferentes concentraciones de proteína. Se observó crecimiento de UFC con la combinación de las proteínas recombinantes, mientras que al no emplearlas se observó crecimiento hasta el día 10 (datos no mostrados) y para el FC no se observó crecimiento (ANEXO 1).

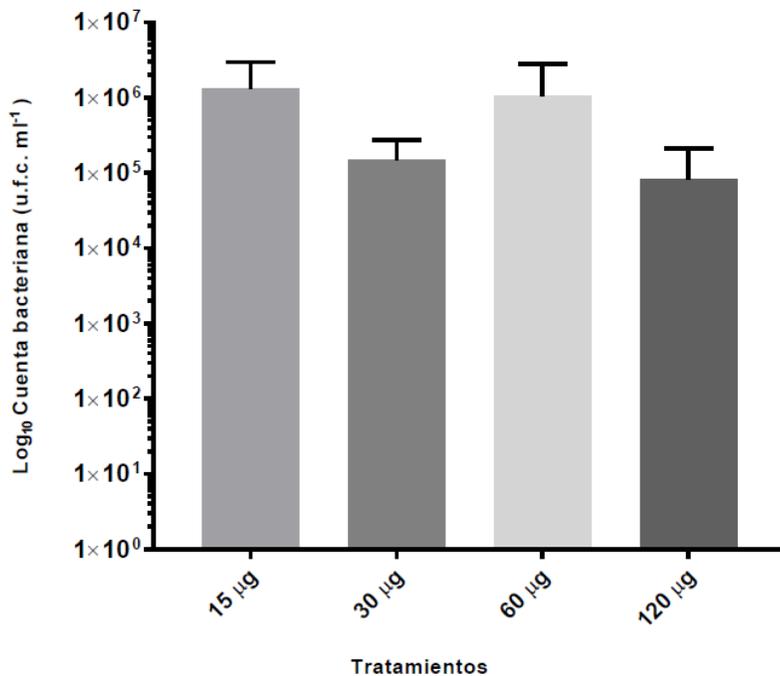


Figura 11. Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre la reactivación de las UFC de *M. bovis* en cultivo 7H10.

5.4 Evaluación de las proteínas recombinantes RipA y RpfB en medio líquido Middlebrook 7H9 en el aumento de bacterias activas de *M. bovis*

La figura 12 muestra una gráfica de la relación entre la concentración de bacterias y el tiempo post-inoculación de las proteínas en las bacterias activas; desde los tres días post-inoculación la combinación de las dos proteínas (RipA + RpfB) muestra mejor resultado a 15 μg (A) (ANEXO 2, 4, 6, 8, 10).

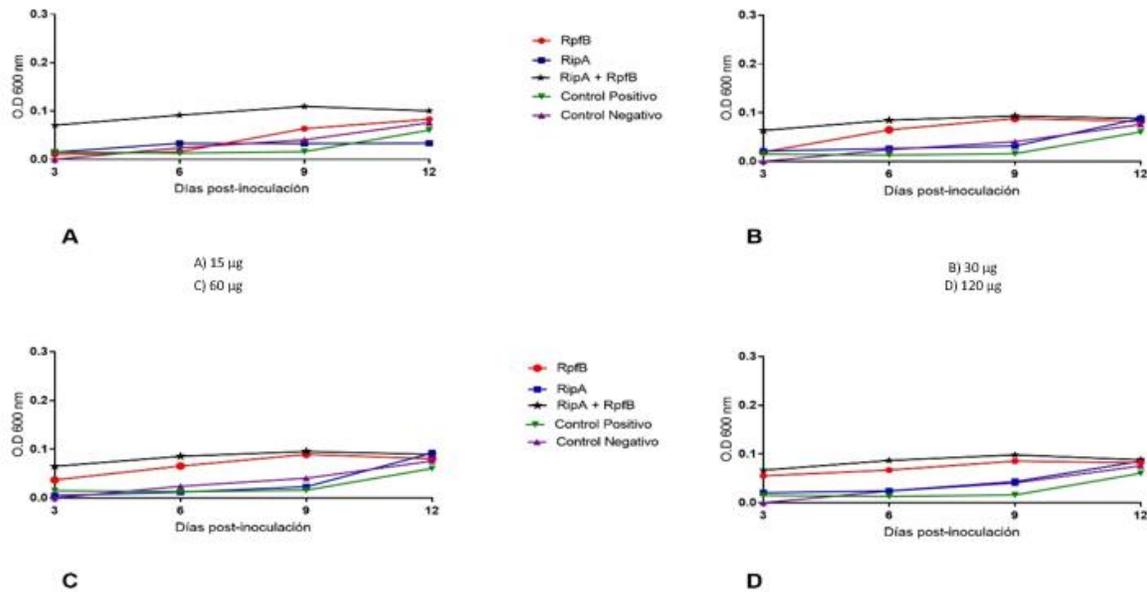


Figura 12. Efecto de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y la combinación (RipA + RpfB) sobre el aumento de la densidad óptica de bacterias activas de *M. bovis* en medio 7H9.

5.5 Evaluación de las proteínas recombinantes RipA y RpfB en medio líquido Middlebrook 7H9 en la reactivación de las bacterias dormantes de *M. bovis*

La figura 13 muestra una gráfica de la relación entre la concentración de bacterias y el tiempo post-inoculación de las proteínas en las bacterias dormantes; el efecto de la combinación de las proteínas (RipA + RpfB) a 30 µg totales (**B**) se ve aumentado en comparación de las otras dos proteínas a la misma concentración. Con 60 µg de RpfB (**C**) se observó mayor crecimiento (ANEXO 2, 5, 7, 9, 11).

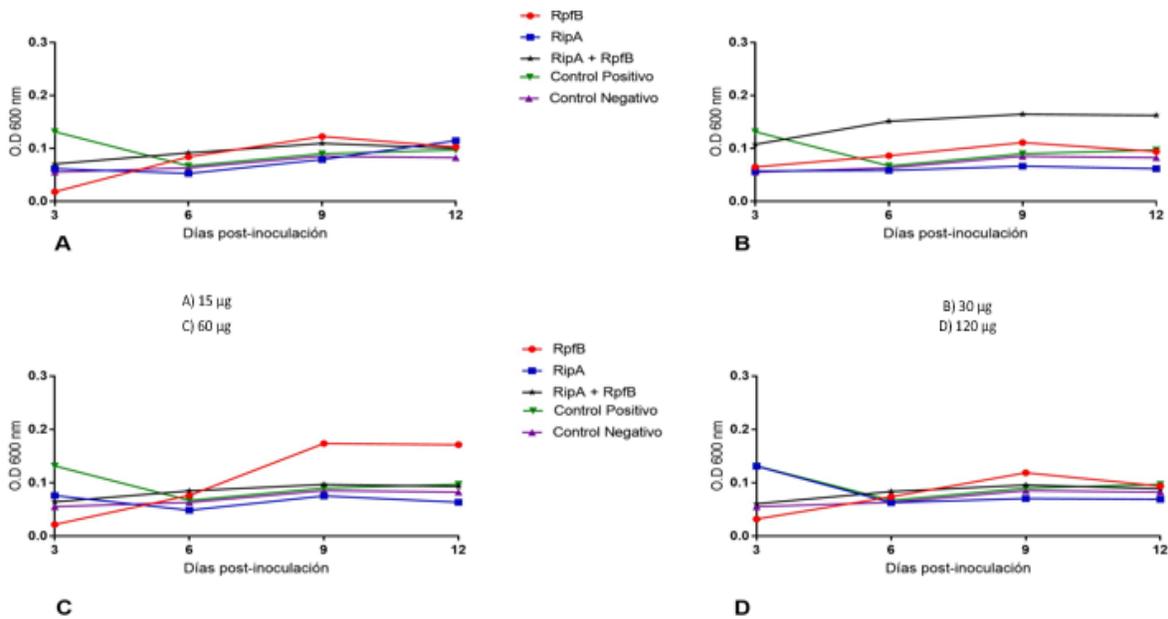


Figura 13. Efecto de las proteínas recombinantes RipA, RpfB y la combinación (RipA + RpfB) sobre el aumento de la densidad óptica de bacterias dormantes de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6 Evaluación de las proteínas recombinantes RipA y RpfB en medio Middlebrook 7H9 en el aumento de bacterias totales en estado activo y dormante de *M. bovis* mediante microscopía (cámara de Neubauer) a los 12 días post-inoculación de las bacterias con la proteína.

5.6.1 Evaluación de RipA en el aumento de bacterias activas

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias activas con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 30 µg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

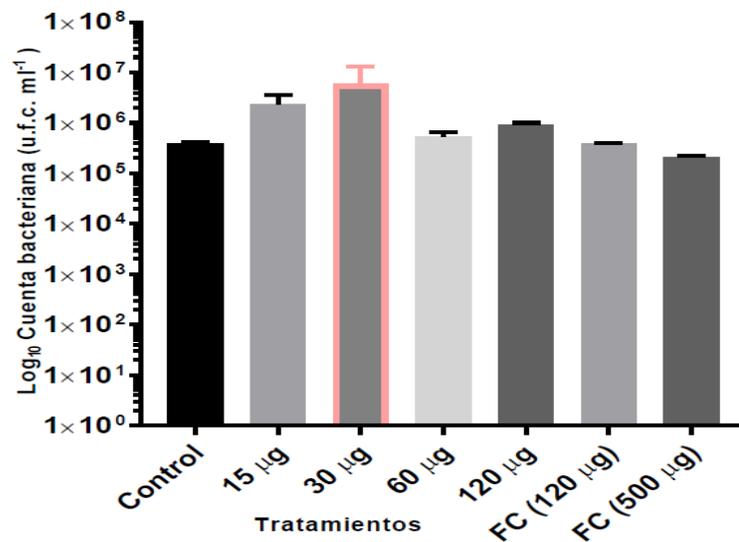


Figura 14. Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento del número total de bacterias activas de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6.2 Evaluación de RipA en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias dormantes con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 30 μg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

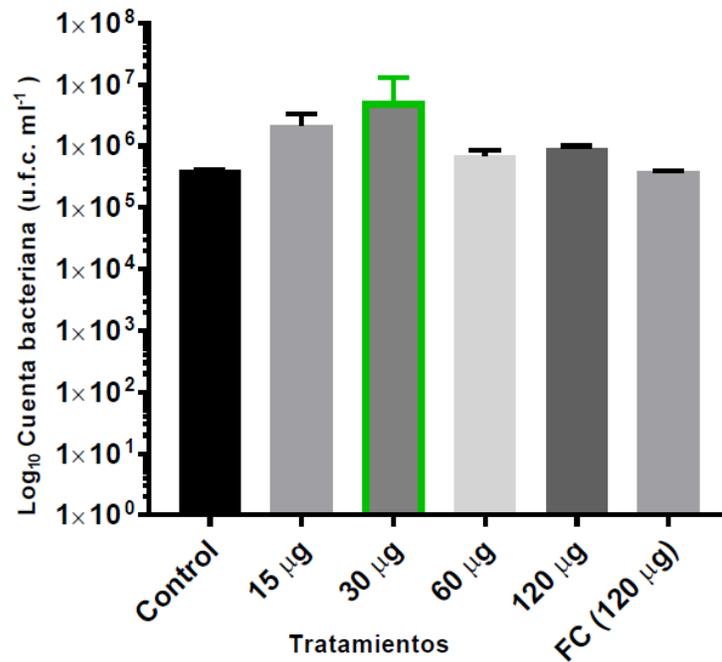


Figura 15. Efecto de la proteína recombinante RipA sobre el aumento del número total de bacterias dormantes de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6.3 Evaluación de RpfB en el aumento de bacterias activas

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias activas con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 30 μg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

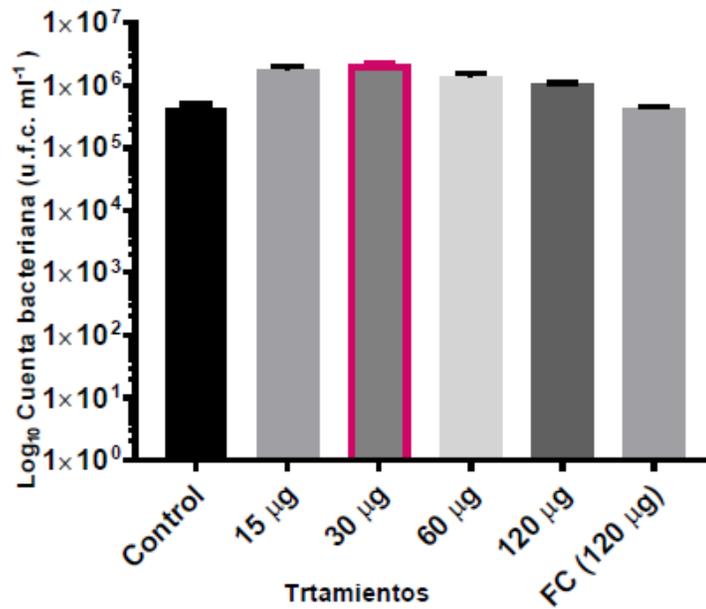


Figura 16. Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6.4 Evaluación de RpfB en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias dormantes con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 60 μg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

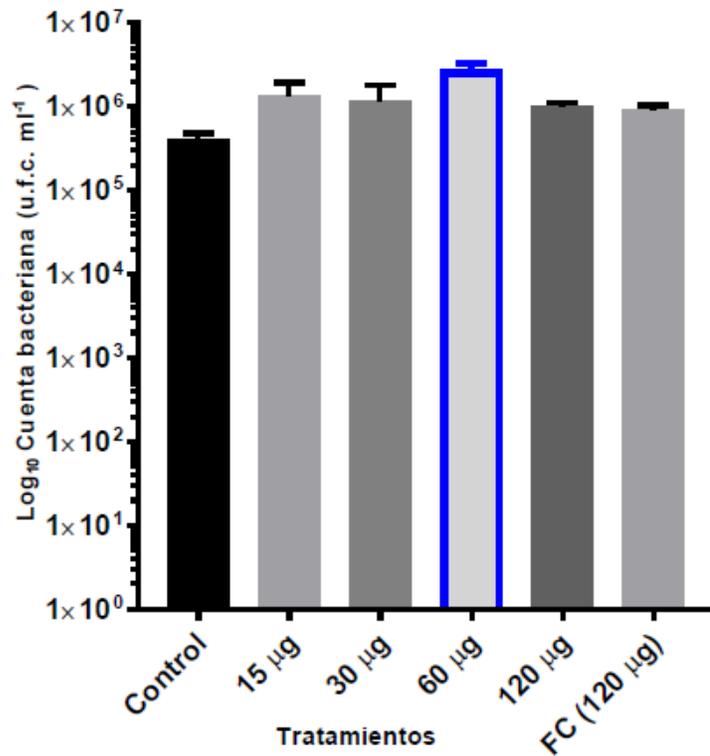


Figura 17. Efecto de la proteína recombinante RpfB sobre el aumento del número total de bacterias dormantes de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6.5 Evaluación de RipA y RpfB en el aumento de bacterias activas

En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias activas con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 30 μg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

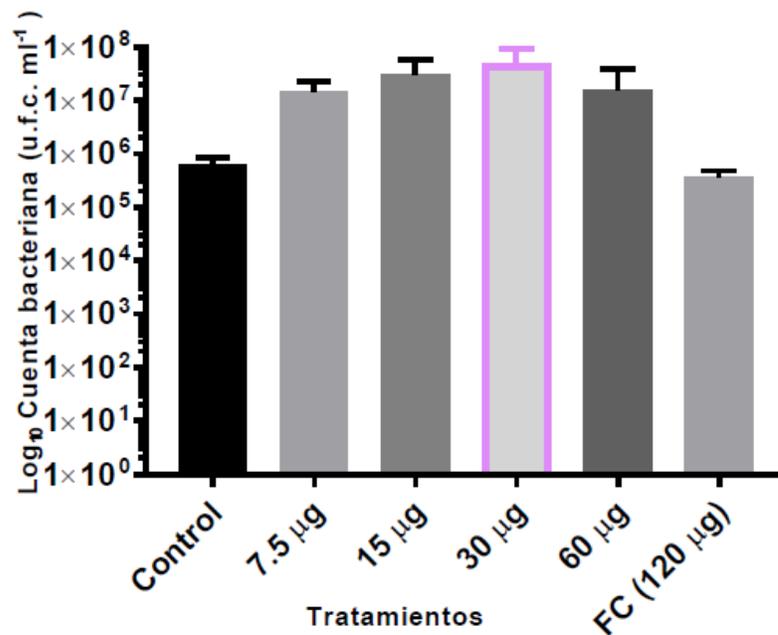


Figura 18. Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento del número total de bacterias activas de *M. bovis* en medio 7H9.

5.6.6 Evaluación de RipA y RpfB en la reactivación de bacterias dormantes

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos tras el conteo en cámara de Neubauer de las bacterias dormantes con la proteína. Se observó diferencia significativa en el tratamiento de 7.5 μg en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$) (ANEXO 3).

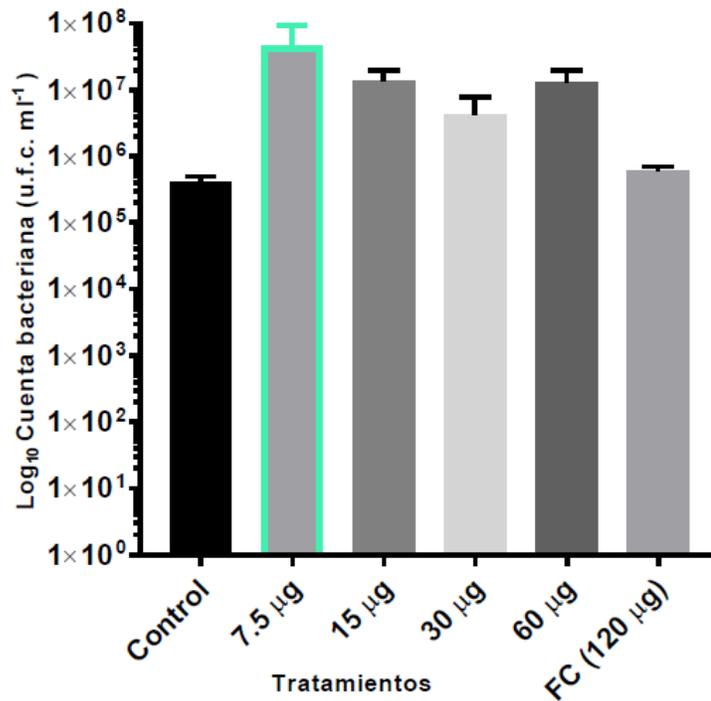


Figura 19. Efecto de las proteínas recombinantes RipA y RpfB sobre el aumento del número total de bacterias dormantes de *M. bovis* en medio 7H9.

Finalmente, en el cuadro 4 se muestran los mejores resultados obtenidos en la evaluación de las proteínas recombinantes en el aumento de bacterias y en la reactivación celular de *M. bovis*.

Cuadro 4. Resumen de mejores resultados obtenidos con cada tratamiento evaluado con bacterias activas de *M. bovis*.

Proteína	UFC	DO	Microscopia
RipA	15 µg (14 días)	60 µg (12 días)	30 µg (12 días)
RpfB	120 µg (9 días)	* (12 días)	30 µg (12 días)
RipA + RpfB	15 µg (2 días)	* (12 días)	30 µg (12 días)

* Sin diferencia estadística.

Cuadro 5. Resumen de mejores resultados obtenidos con cada tratamiento evaluado con bacterias dormantes de *M. bovis*.

Proteína	UFC	DO	Microscopia
RipA	30 µg (17 días)	15 µg (12 días)	30 µg (12 días)
RpfB	30 µg (9 días)	60 µg (12 días)	60 µg (12 días)
RipA + RpfB	15 µg (2 días)	30 µg (12 días)	15 µg (12 días)

VI. DISCUSIÓN

El interés mundial en el control y erradicación de la TBb se justifica tradicionalmente no solo por el deterioro cuantitativo y cualitativo de los principales indicadores productivos y reproductivos que provoca en esta especie, también por los incrementos en los costos de producción que genera su diagnóstico, las pérdidas económicas debido al sacrificio sanitario aplicado para su control, su transmisibilidad hacia los humanos, y por las persistentes e inmediatas restricciones comerciales que se les aplican a las producciones ganaderas procedentes de los países afectados (Müller et al., 2013; Hawn et al., 2014).

La familia de factores promotores de crecimiento de bacterias, pueden proporcionar nuevas oportunidades para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis bovina y dado que la tuberculosis bovina sigue siendo un problema de salud animal importante, nuevas herramientas para el control de la enfermedad en la vida silvestre y / o ganado doméstico, como las vacunas y pruebas de diagnóstico mejoradas, se necesitan urgentemente. Es por eso que el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de las proteínas RipA, RpfB y su combinación en el crecimiento de *Mycobacterium bovis* AN5 en cultivos líquidos y sólidos, empleando bacterias dormantes y activas.

Las micobacterias son organismos aeróbicos estrictos, capaces de adaptarse y sobrevivir a un ambiente hipóxico, al entrar en un estado no replicante o de dormancia. Se considera que el estado dormante de la micobacteria puede estar implicado en la persistencia de la infección por tuberculosis a pesar de la quimioterapia prolongada (Rustad et al., 2009). La reactivación de las células dormantes es promovida por una familia de enzimas hidrolasas conocidas como factores promotores de resucitación (Rpfs), capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos esenciales en el mantenimiento de la capa de peptidoglicano (Nikitushkin et al., 2016). RpfB, uno de los cinco Rpf secretados por *M. bovis*, tiene un papel crucial en la reanimación y el crecimiento de la estimulación de la

micobacteria latente. RpfB es la más compleja de las cinco, estimula la resucitación de las células dormantes, aumenta el número de bacterias en cultivos de hasta tres meses de incubación, estimula el crecimiento en la fase estacionaria, se activa a concentraciones picomolares, hidroliza enlaces que mantienen la estabilidad en la pared celular. RipA es una proteína asociada a la célula, se requiere para la separación normal de las células hijas tras la división celular y la integridad de la pared celular. Es también necesaria para la invasión de la célula huésped. En combinación con RipA (RipA + RpfB) tiene actividad sinérgica, ambas proteínas actúan como un complejo proteína-proteína sobre la degradación del peptidoglicano (Hett et al., 2007; Gupta & Srivastava, 2012; Nikitushkin et al., 2015).

El hecho de que *M. bovis* tenga una tasa de crecimiento lento y que tienda a formar grumos cuando se cultiva en medios líquidos, hace más difícil el estudio del crecimiento de micobacterias por métodos comúnmente utilizados para otras bacterias. El método estándar de recuento de células en placa requiere de al menos tres semanas para dar resultados y frecuentemente falla. Por otra parte, la medición de la turbidez funciona mejor con cultivos que contienen detergentes (von Groll et al., 2010). Sin embargo, la determinación de la cinética de crecimiento de *M. bovis* tiene amplias aplicaciones en la investigación de la tuberculosis. Ha sido útil para evaluar y comparar la aptitud de las bacterias en los casos de: estrés ambiental, alteraciones en la regulación de genes y la presencia de mutaciones genéticas asociadas con la resistencia a fármacos.

En el presente trabajo se evaluó la cinética de crecimiento de *M. bovis* AN5 en medio líquido no enriquecido (medio mínimo Sauton) durante 50 días, la adaptación de la micobacteria fue muy rápida pese a que el medio carecía de nutrientes. Durante el período de evaluación de la cinética de crecimiento observamos como el tiempo de duplicación cambiaba conforme aumentaba el periodo de incubación, alcanzando la fase estacionaria a los 13 días; Castillo (2013) evalúa la cinética de crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926, BCG alcanzó su fase logarítmica intermedia entre los 7-8 días post-incubación y *M. bovis* 9926 a los 13-14 días post-incubación, aunque su medio de cultivo contenía nutrientes. No

obstante, la densidad óptica nunca aumento a más de 0.3 OD 600nm en el medio Sauton, comparando con las densidades reportadas en medio enriquecido (Figura 5), lo que sugiere que el estado metabólico de las bacterias disminuye conforme pasa el tiempo.

Las células dormantes o bacterias viables, pero no cultivables (VBNC) se caracterizan por perder la capacidad de formar colonias en medios convencionales. En el presente trabajo para obtener células dormantes, la inducción a la dormancia se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento y a lo reportado por Shleeva et al., (2003), así se decidió hacer la inducción de la dormancia por cuatro meses y sin adicionar enriquecimiento al medio de cultivo (medio mínimo Sauton). Para obtener la fracción de células dormantes fue necesario realizar una serie de filtraciones con membranas de diferente tamaño de poro. Las células no cultivables en la membrana de filtro de 1.5 μm están representadas por una mezcla de células ovoides con una longitud de aproximadamente 1.1 μm (Shleeva et al., 2002; Shleeva et al., 2003), en nuestros resultados encontramos como a los 120 días de dormancia el número de células presentes en la membrana de filtro de 1.5 μm aumenta en el conteo microscópico (cámara de Neubauer); sin embargo, su capacidad de formar colonias en medio sólido disminuye (UFC), (Cuadro 3), así como también se retrasa el tiempo de crecimiento hasta los 46 días. Por lo cual podemos concluir que bajo este procedimiento es posible obtener células dormantes de *M. bovis*.

Nosotros evaluamos la capacidad de las proteínas RpfB y RipA en la resucitación de las células dormantes de *M. bovis* y en el aumento del crecimiento de células viables de *M. bovis*, debido a que ambos estados bacterianos pueden encontrarse en los tejidos de animales infectados.

Respecto a la actividad de las proteínas en células viables (activas) de *M. bovis* observamos que con 15 μg de RipA fue posible observar crecimiento en placa (UFC) a los 14 días post-inoculación, mientras que con RpfB con 120 μg de proteína se observaron UFC a los nueve días. En el control negativo (sin proteína) de RipA como de RpfB el crecimiento se observó hasta el día 14. Sin embargo, cuando se

usan las dos proteínas en conjunto con 15 µg de proteína total (7.5 µg de cada una RipA + RpfB) se observa crecimiento desde los dos días post-inoculación. Esto es realmente relevante si se considera que la tasa de crecimiento de *M. bovis* en medio Middlebrook 7H10 o 7H11 es de 20-28 días y de 36 días con medio Stonebrink, Wu et al., (2008) reportan para *M. bovis* BCG la formación de colonias en medio sólido (BACTEC 960 adicionado con OADC) con la utilización de 0.5 mg de RpfB se inició a los 11 días post-inoculación y con Lowenstein-Jansen el crecimiento inició a partir de los ocho días post-inoculación. Por lo que podríamos sugerir que al emplear 15 µg de proteína total de RpfB + RipA la actividad sinérgica de estas proteínas reduce la tasa de crecimiento de *M. bovis* en medio Middlebrook 7H10 con OADC.

La actividad de las proteínas con las bacterias dormantes fue similar, pues con 30 µg de RipA se observó crecimiento en medio Middlebrook 7H10 con OADC a los 17 días, con 30 µg de RpfB a los nueve días. No obstante, al usar en conjunto estas proteínas RipA + RpfB con 15 µg de proteína total, se observó crecimiento desde los dos días post-inoculación. Estos resultados nos muestran que la interacción de RipA con RpfB puede dar lugar a una mayor actividad hidrolítica llevando a la potencialización de las proteínas al combinarlas, tanto para bacterias activas como para dormantes. Las proteínas recombinantes en forma de coctel pueden ser usadas como promotores del crecimiento y de reactivación de *M. bovis* AN5 acortando el tiempo de cultivo. Siendo relevante para la obtención de un resultado de laboratorio más rápido.

La evaluación de la actividad de ambas proteínas también se realizó en medio líquido, con el objetivo de tener una mayor certeza del resultado obtenido en la estimación de UFC y verificar a partir de que día se observa el fenómeno inducido por las proteínas. Por espectrofotometría se observó que con 30 µg de RipA o 30 µg de RpfB se observó un mejor crecimiento desde los tres días post-inoculación; mientras que, es necesario 120 µg de proteína total del cóctel RipA + RpfB para observar crecimiento a los tres días. Sin embargo, por microscopia a los 12 días post-inoculación pudimos verificar que la mejor concentración a emplear para cada proteína o en combinación es de 30 µg.

La actividad de las proteínas en medio líquido con bacterias dormantes mostró que con 15 µg y 60 µg de RipA y RpfB respectivamente a los 12 días, se observa un mejor crecimiento; mientras que con 30 µg de la combinación de RipA + RpfB se observa crecimiento desde los tres días. Estos datos son similares por microscopia (Cuadro 5) (30 µg para RipA, 60 µg para RpfB y 15 µg para RipA + RpfB a los 12 días).

Los resultados obtenidos en medio sólido y líquido son diferente, en el sentido que los datos nos muestran que con 15 o 30 µg del cóctel RipA + RpfB es posible observar crecimiento de *M. bovis* en estado activo o dormante desde los dos días. Mientras que en cultivos líquidos es necesario emplear 120 o 30 µg para bacterias activas y dormantes respectivamente, observando crecimiento a partir del tercer día. Esto puede deberse a que las proteínas en medio sólido están en mayor contacto con las bacterias, por lo que podrían ejercer su actividad más fácilmente; mientras que el medio líquido se cultivó sin agitación, así quizá las proteínas no pudieron alcanzar fácilmente su blanco y se diluyeron en el medio líquido. Esto tendría que comprobarse en otros estudios, empleando cultivos en estático y con agitación y evaluando otros factores como el pH, el cual puede afectar la actividad enzimática de las proteínas.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que la adición de proteína individual (RipA o RpfB) o una combinación de las dos al medio de cultivo, estímulo significativamente el aumento de las bacterias activas; así como la reanimación de las bacterias inicialmente inactivas. Nuestros resultados concuerdan con los reportados para *M. smegmatis* por Nikitushkin et al., (2015).

Todos los reportes existentes con la utilización de proteínas recombinantes son para *M. tuberculosis* donde Galina et al (2010) emplearon RpfB a 20 nM en medios 7H9 y 7H10 en esputo, teniendo resultados positivos; en el trabajo realizado por Shleeva et al (2002) muestran que la presencia de concentraciones picomolares de proteína recombinante Rpf promueve el incremento de 1-2 logaritmos en la viabilidad celular. En *M. smegmatis* en los resultados de Shleeva et al (2004) con la adición de Rpf de *Micrococcus luteus* obtuvieron como resultado una reanimación

menos pronunciada. Sin embargo, este efecto fue altamente variable para diferentes lotes de proteína recombinante, lo que sugiere que el efecto observado fue probablemente limitado por la concentración de moléculas biológicamente activas en la preparación de proteínas. Con *M. bovis* BCG Wu et al (2008) utilizaron RpfB en medio Lowenstein-Jensen y obtuvieron crecimiento a partir de los ocho días post-inoculación. Por lo que podemos concluir que nuestros resultados sugieren que la mejor opción para promover el crecimiento de las micobacterias en cultivo es la utilización de un cóctel proteico formado por las proteínas RpfB y RipA.

Como perspectivas de este trabajo se propone la evaluación de las proteínas recombinantes (RipA + RpfB) en tejidos provenientes de animales infectados. Así como determinar el número mínimo de bacterias que debe tener un tejido para poder ser detectado mediante diagnóstico en laboratorio, esto se puede hacer mediante la inoculación de (4 hasta 40 000) bacterias activas, haciendo diluciones 1 en 10.

VII. CONCLUSIONES

RipA puede ser utilizada para aumentar el número de bacterias activas en cultivos sólidos. Así como también disminuir el tiempo de obtención de UFC.

La adición de RipA en bacterias dormantes promueve la resucitación bacteriana en medio líquido, así como el aumento de bacterias activas.

RpfB disminuye el tiempo de cultivo en medio sólido, obteniendo UFC a partir de los nueve días post-inoculación.

La combinación de las proteínas recombinantes en medios sólidos y líquidos dan como resultado la obtención de UFC en menor tiempo, tanto para bacterias activas como para bacterias dormantes.

Se puede concluir que la utilización de estas proteínas a bajas concentraciones produce reactivación bacteriana y aumenta el número de bacterias activas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A., Gutierrez-Pabello, J., Suárez-Güemes, F., McNair, J., Cataldi, A., Espitia, C., Anderson, P. & Pollock, J. 2006. Optimizing Antigen Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *J Clin Microbiol.* 44 (12):4326-4335.
- Abalos, P. & Retamal, P. 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. Sci. Tech. Off. Int Epiz.* 23 (2): 583-594.
- Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M. & Acosta, A. 2009. Mecanismo de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *VacciMonitor.* 18 (3):18-25.
- Behar, S., Divangahi, M. & Remold, H. 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol.* 8 (9):668-674.
- Bennett, R. & Cooke, R. 2006. Coast to farmers of a tuberculosis breakdown. *Vet Rec.* 158 (13): 429-432.
- Bernardelli, A. 2007. Producción y control de tuberculina bovina y aviar Derivado Proteico Purificado (DPP). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Buenos Aires: Coordinación de Bacteriología, Parasitología y Zooterápicos, Dirección de Laboratorio y Control Técnico. 74 pp. URL: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1011-tuberbov.pdf.

- Biet, F., Boschioli, M., Thorel, M. & Guilloteau, L. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res.* 36 (3): 411-436.
- Blanco, F., Bianco, M., Meikle, V., Garbaccio, S., Vagnoni, L., Cataldi, A. & Bigi, F. 2011. Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*. *RIA.* 37 (2):189–192.
- Boland, F., Kelly, G., Good, M. & More, S. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infeted dairy herds in Ireland. *Prev Vet Med.* 93 (2-3): 153-161.
- Boneca, I. 2005. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology.* 8(1):46–53.
- Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 83 (1-3):91–97.
- Buddle, M., de Lisle, W., Griffin, J. & Hutchings, A. 2015. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N Z Vet J.* 1:19-27.
- Castilho, A., Caleffi-Ferracioli, K., Canezin, P., Dias, V., de Lima, R. & Fressatti, R. 2015. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. *J Microbiol Meth.* 111: 119-121.
- Castillo, U. 2013. Caracterización de las vías de señalización asociadas a la activación celular en macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Chatterjee, M., Bhattacharya, S., Karak, K. & Dastidar, S. 2013. Effects of different methods of decontamination for successful cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Indian Journal of Medical Research,* 138 (4): 541–548.
- Chisholm, R. & Tanaka, M. 2016. The emergence of latent infection in the early evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Biol Sci.* 283 (1831):1-8.

- Corner, L. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* 40: 53-63.
- Corner, L. 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol.* 112: 303-312.
- Corner, L., Gormley, E. & Pfeiffer, D. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximizing the number of positive cultures. *Vet Microbiol.* 156 (1-2):162–71.
- Cousins, D. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 20 (1): 71-85.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S. & de la Rua-Domenech, R. 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec.* 163 (4): 127.
- de Kantor, I. & Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol.* 112 (2-4):111-118.
- de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A., Vordermeier, H., Hewinson, R., Christiansen, K. & Clifton-Hadley, R. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81 (2): 190-210.
- Delahay, R., Leeuw, A., Barlow, A., Clifton-Hadley, R. & Cheeseman, C. 2002. The Status of *Mycobacterium bovis* Infection in UK Wild Mammals: A Review. *Vet J.* 164: 90-105.
- Downing, K., Betts, J., Young, D., McAdam, R., Kelly, F. & Mizrahi, V. 2004. Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy. *Tuberculosis.* 84 (3-4): 167-179.
- Enarson, D., ElSohy, A., Chen-Yuang, C. & Rusen, I. 2009. Chapter 77 – Issues in global tuberculosis control. *Tuberculosis.* 786-795.

- Esteban, J., Fernández, R. & Soriano, F. 2000. Rapidly growing mycobacteria in human pathology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 18 (6):279-286.
- Francis, J. 1971. Susceptibility to Tuberculosis and the Route of Infection. *A Vet J.* 47(9):414.
- Gallagher, J. & Clifton-Hadley, R. 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res Vet Sci.* 69 (3): 203-217.
- Good, M., Higgins, I. & Maher, P. 2007. The tuberculin test: a safe means to test a cattle population for bovine tuberculosis. *Irish Vet J.* 60: 680-684.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M., Suzuki, K., Ludwig, W. & Whitman, W. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria, Part A. Vol. IV. Second edition* New York. Editorial Board.
- Gormley, E., Corner, L., Costello, E. & Rodríguez-Campos, S. 2014. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Res Vet Sci.* 97: S30-S43.
- Gormley, E., Doyle, M., Fitzsimons, T., McGill, K. & Collins, J. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam R) assay. *Vet Microbiol.* 112: 171–179.
- Gupta, R. & Srivastava, R. 2012. Resuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant mycobacteria. *Indian J Microbiol.* 52 (2): 114-121.
- Han, P., Orta, P., Kwon, D. & Inman, J. 2015. *Mycobacterium bovis* cervical lymphadenitis: A representative case and review. *Int J Pediatr Otorhi.* 79: 1798-1801.
- Hawn, R., Day, A., Scriba, J., Hatherill, M., Hanekom, A., Evans, G., et al. 2014. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Microbiol Mol Biol Rev.* 78 (4): 650-71.

- Hett, E. 2007. Essential Cell Division Enzymes of Micobacteria: Implications on Resuscitation from Dormancy. Harvard University. URL: <http://search.proquest.com/docview/304846863>. Citado el 26 de agosto 2016.
- Hett, E., Chao, M., Steyn, A., Fortune, S., Deng, L. & Rubin, E. 2007. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol. 66 (3):658–668.
- Hett, E., Chao, M., Deng, L. & Rubin, E. 2008. A Micobacterial Enzyme Essential for Cell Division Synergizes with Resuscitation-Promoting Factor. PLoS. Pathog. 4 (2) e1000001.
- Hett, E, Chao, M. & Rubin, E. 2010. Interaction and Modulation of Two Antagonistic Cell Wall Enzymes of Micobacteria. PLoS. Pathog. 6 (7): e1001020.
- Hines, N., Payeur, J. & Hoffman, L. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. J Vet Diagn Invest. 18 (3): 243-250.
- Humblet, M., Boschioli, M. & Saegerman, C. 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. Vet Res. 40 (5): 50-74.
- Jawetz, E., Melnick J. & Abelberg, A. 1996. Microbiología Médica. 15va Edición. Editorial Manual Moderno S. A. México. 807 pp.
- Jones, S. & Lennon, J. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 107 (13): 5881-5886.
- Kana, B. & Mizrahi, V. 2010. Resuscitation promoting factors in bacterial population dynamics during TB infection. 7 (1): e13-e18.
- Kaneene, J. & Pfeiffer, D. 2008. Chapter 5 – Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans (Second edition, pp. 34-48).

- Kleeberg, M. 1984. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 3:11–32.
- López, L., Pohlenz, A., Bravo, J. & Zepeda, H. 2007. Tuberculosis bovina: ¿zoonosis re-emergente? URL: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol20num3/articulos/tuberculosis/>
Citado el 10 de mayo del 2016.
- Magombedze, G. & Mulder, N. 2012. A mathematical representation of the development of *Mycobacterium tuberculosis* active, latent and dormant stages. *J Theor Biol.* 292: 44-59.
- Michel, A., Bengis, R., Keet, D., Hofmeyr, M., de Klerk, L., Cross, P., Jolles, A., Cooper, D., Whyte, I., Buss, P. & Godfroid, J. 2006. Wildlife tuberculosis in South Africa conservation areas: Implications and challenges. *Vet Microbiol.* 112: 91-100.
- Michel, A., Müller, B. & van Helden, P. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol.* 140 (3-4): 371-381.
- Milián-Suazo, F., Salman, M., Ramirez, C., Payeur, J., Rhyan, J. & Santillan, M. 2000. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am J Vet Res.* 61 (1):86-89.
- Muamolova, G., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G. & Barrer, M. 2010. Resuscitation-promoting Factors Reveal an Occult Population of Tubercle Bacilli in Sputum. *Am J Respir Crit Care Med.* 181 (2):174–180.
- Muamolova, G., Kaprelyants, A., Young, D., Young, M. & Kell, D. 1998. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 (15): 8916-8921.
- Muamolova, G., Murzin, A., Salina, E., Demina, G., Kell, D., Kaprelyants, A. & Young, M. 2006. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol. Microbiol.* 59b (1):84–98.

- Mukamolova, G., Turapov, O., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A., Kell, D. & Young, M. 2002a. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol* 46: 611–621.
- Mukamolova, G., Turapov, O., Young, D., Kaprelyants, A., Kell, D. & Young, M. 2002b. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 46 (3):623-635.
- Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J. & Laise, C. 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*. 19 (6):899-908.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & de la Fuente, J. 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol*. 127: 1-9.
- Nava, O., Hassanhi, M. & Prieto, L. 2005. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera*. 33 (2): 119-131.
- Navarro, Y., Herranz, M., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L. & García-de-Viedma, D. 2014. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci*. 96: 422-425.
- Nikitushkin, V., Demina, G., Shleeva, M., Guryanova, S., Ruggiero, A., Berisio, R. & Kaprelyants, A. 2015. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS J*. 282 (13): 2500-2511.
- Nikitushkin, V., Demina, G. & Kaprelyants, A. 2016. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of actinobacteria. *Biochemistry*. 81 (13): 1719-1734.
- O'Connor, C., Haydon, D. & Kao, R. 2012. An ecological and comparative perspective on the control of bovine tuberculosis in Great Britain and the Republic of Ireland. *Prev Vet Med*. 104(3-4): 185-197.

- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2004. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. URL: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Palmer, M. 2007. Tuberculosis: A reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol.* 315: 195-215.
- Palmer, M., Waters, W. & Whipple, D. 2003. Aerosol exposure of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis.* 39 (4): 817–823.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y. & García-de-Viedna, D. 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Res Vet Sci.* 97: S94-S100.
- Phillips, C., Foster, C., Morris, P. & Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci.* 74 (1): 1-15.
- Pollock, J. & Neill, S. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.* 163 (2): 115-127.
- Ramdas, E., Lyashchenko, P., Greenwald, R., Austerman, S., McManis, C. & Waters, R. 2015. *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis.* 21 (3): 480-3.
- Ramos, D., Silva, P. & Dellagostin, O. 2015. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Braz J Biol.* DOI: [10.1590/1519-6984.23613](https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613).
- Ravagnani, A., Finan, C. & Young, M. 2005. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. *BMC Genomics.* 6:39.
- Retamal, P., Martínez, A. & Abalos, P. 2003. Secuencias de inserción *is6110* e *is1081* en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Rev Chil Infect.* 20 (3): 166-170.

- Rivera, S., Jiménez, J. & Deward, J. 2009. Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient.* 19 (6): 566-575.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J., Mateos, A., Domínguez, L. & Aranaz, A. 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol.* 141 (1-2): 89-95.
- Romano, M., Aryan, E., Korf, H., Bruffaerts, N., Franken, C., Ottenhoff, T. & Huygen, K. 2012. Potential of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines. *Microbes Infect.* 14 (1): 86-95.
- Rothel, J., Jones, S., Corner, L., Cox, J. & Wood, P. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 67 (4): 134–137.
- Ruggiero, A., Marasco, D., Squeglia, F., Soldini, S., Pedone, E., Pedone, C. & Berisio, R. 2010. Structure and functional regulation of RipA, a mycobacterial enzyme essential for daughter cell separation. *Structure.* 18 (9): 1184-1190.
- Ruggiero, A., Tizzano, B., Geerlof, A., Pedone, E., Pedone, C., Wilmanns, M. & Berisio, R. 2007. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a resuscitation-promoting factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 63: 870-873.
- Rustard, TR., Sherrid, AM., Minch, KJ. & Sherman, DR. 2009. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol.* 11 (8): 1151-1159.
- Seidi, K. & Jahanban-Esfahlan, R. 2013. A novel approach to eradicate latent TB: Based on resuucitation promoting factors. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas.* 2 (7): 69-74.

- Shleeva, M., Bagramyan, K., Telkov, M., Mukamolova, G., Young, M., Kell, D. & Kaprelyants, A. 2002. Formation and resuscitation of 'nonculturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiol.* 148: 1581-1591.
- Shleeva, M., Mukamolova, G., Telkov, M., Berezinskaya, T., Syroeshkin, A., Biketov, S. & Kaprelyants, A. 2003. Formation of Nonculturable Cells of *Mycobacterium tuberculosis* and Their Resuscitation. *Microbiol.* 72 (1): 64-70.
- Shleeva, M., Mukamolova, G., Young, M., Williams, H. & Kaprelyants, A. 2004. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiol.* 150: 1687–1697.
- Shu, D., Heiser, A., Wedlock, DN., Luo, D., de Lisle, GW. & Buddle, BM. 2014. Comparison of gene expression of immune mediators in lung and pulmonary lymph node granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunop.* 160 (1): 81-89.
- Singh, S., Saraav, I. & Sharma, S. 2014. Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine.* 32 (6):712-716.
- Stone, M., Brown, T. & Drobniewski, F. 2012. Human *Mycobacterium bovis* Infections in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 50 (1): 164-165.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschioli, M. & Besnier, J. 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol.* 50 (1): 164-165.
- Thoen, C. & Barletta, R. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans (Second Edition, pp. 18–33). Iowa, U.S.A.: Blackwell Publishing.
- Thoen, C., Lobue, P. & de Kantor, I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.* 112 (2-4): 339-345.

- Thoen, O., Lobue, P., Enarson, D., Kaneene, J. & de Kantor, I. 2009. Tuberculosis: a re-emerging disease of animals and humans. *Vet Ital.* 45 (1): 135-181.
- Thoen, OC. & Ebel, ED. 2006. Diagnostic tests for bovine tuberculosis. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA. Blacwells. pp. 49-53.
- Tomley, F. & Shirley, M. 2009. Livestock infectious diseases and zoonoses. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 2637-2642.
- Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect.* 15 (10): 906-910.
- TubercuList (Mycobacterium tuberculosis Database). SA. Rv0867c; Rv1009; Rv1884c; Rv2450c. URL: <http://tuberculist.epfl.ch/>. Citado el 17 de noviembre de 2015.
- Tufariello, J., Jacobs, W. Jr & Chan, J. 2004. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 72: 515–526.
- Une, Y. & Mori, T. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30 (5-6): 415-425.
- UniProt (Universal Protein Resource). 2015. RpfA; RpfB; RpfC; RpfD; RpfE URL: www.uniprot.org. Citado el 17 de noviembre de 2015.
- van Asselt, E., Thunnissen, A. & Dijkstra, B. 1999. High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J. Mol. Biol.* 291 (4):877–898.
- Velayati, A., Abeel, T., Shea, T., Konstantinovich, G., Birren, B., Cassell, G., Earl, A., Hoffner, S. & Farnia, P. 2016. Populations of latent *Mycobacterium tuberculosis* lack a cell wal: Isolation, visualization, and whole-genome characterization. *Int J Mycobacteriol.* 5 (1): 66-73.
- Velayati, A., Farnia, P. & Masjedi, M. 2012. Latent tuberculosis (TB) bacilli: Yes or no to preventive chemotherapy. *Int J Mycobacteriol.* 1 (1): 1-2.

- Viena-Niero, C., Rodríguez, C., Bigi, F., Zanini, M., Ferreira-Neto, J., Cataldi, A. & Leão, S. 2006. Identification of an IS6110 insertion site in plcD, the unique phospholipase C gene of *Mycobacterium bovis*. J Med Microbiol. 55 (Pt4): 451-457.
- Vordermeier, H., Whelan, A. & Hewinson, R. 2008. The scientific case for the gamma-interferon Bovigam assay. Gov Vet J. 19: 38-43.
- Wivagg, C. & Hung, D. 2012. Resuscitation-Promoting Factors Are Required for β -Lactam Tolerance and the Permeability Barrier in *Mycobacterium tuberculosis*. J ASM. 56 (3): 1591-1594.
- Wood, P. & Jones, S. 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis Edinb. 81 (1-2): 147-155.
- Zendejas, MH., Milián, SF., Cuador, GJ., Cruz, BG., Anaya, EA., Huitrón, MG. & García, CL. 2007. Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. Vet Ital. 43 (3): 629-634.
- Zhang, Y. 2004. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. Front Biosci. 1 (9): 1136-1156.
- Zhu, W., Plikaytis, B. & Shinnick, T. 2003. Resuscitation factors from mycobacteria: homologs of *Micrococcus luteus* proteins. Tuberculosis. 83 (4): 261-269.

IX. ANEXO 1

Cuadro 6. Promedio y desviación estándar del conteo de UFC con proteína RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes.

Proteína	µg totales	Promedio	Desviación estándar	P
RipA bacterias activas	15	15333333	2516611	0.0059
	30	10500000	1322875	
	60	1433333	513160	
	120	700000	655743	
	FC	0	0	
	Control	1246666	2124743	
RipA bacterias dormantes	15	13333	23094	0.7787
	30	16666	28867	
	60	13333	23094	
	120	3333	5773	
	FC	0	0	
	Control	0	0	
RpfB bacterias activas	15	33333	57735	0.9186
	30	26666	46188	
	60	30000	51961	
	120	160000	277128	
	FC	0	0	
	Control	10000	17320	
RpfB bacterias dormantes	15	0	0	0.2277
	30	60000	17320	
	60	3333	5773	
	120	3333	5773	
	FC	0	0	
	Control	0	0	
RipA + RpfB bacterias activas	15	1366666	1305118	0.2194
	30	1203333	1741273	
	60	370000	572363	
	120	106666	143643	
	FC	0	0	
	Control	0	0	
RipA + RpfB bacterias dormantes	15	1300000	1643198	0.0696
	30	150000	124899	
	60	1036666	1786906	
	120	83333	127410	
	FC	0	0	
	Control	50000	86602	

X. ANEXO 2

Cuadro 7. Promedio y desviación estándar de la densidad óptica con proteína RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes

Proteína	µg totales	Promedio de la densidad óptica	Desviación estándar	P
RipA bacterias activas	15	0.03	0.007	0.0020
	30	0.08	0.004	
	60	0.09	0.003	
	120	0.08	0.004	
	FC	0.09	0.007	
	Control	0.07	0.007	
RipA bacterias dormantes	15	0.1	0.03	0.0174
	30	0.08	0.04	
	60	0.08	0.04	
	120	0.08	0.03	
	FC	0.1	0.001	
	Control	0.1	0.001	
RpfB bacterias activas	15	0.08	0.0008	0.2157
	30	0.08	0.003	
	60	0.08	0.005	
	120	0.08	0.002	
	FC	0.02	0.001	
	Control	0.1	0.001	
RpfB bacterias dormantes	15	0.1	0.002	0.0478
	30	0.09	0.001	
	60	0.1	0.07	
	120	0.08	0.05	
	FC	0.1	0.004	
	Control	0.1	0.0007	
RipA + RpfB bacterias activas	15	0.07	0.008	0.0299
	30	0.08	0.001	
	60	0.08	0.001	
	120	0.08	0.005	
	FC	0.08	0.0009	
	Control	0.1	0.002	
RipA + RpfB bacterias dormantes	15	0.1	0.002	0.0012
	30	0.17	0.04	
	60	0.09	0.002	
	120	0.08	0.001	
	FC	0.1	0.002	
	Control	0.07	0.002	

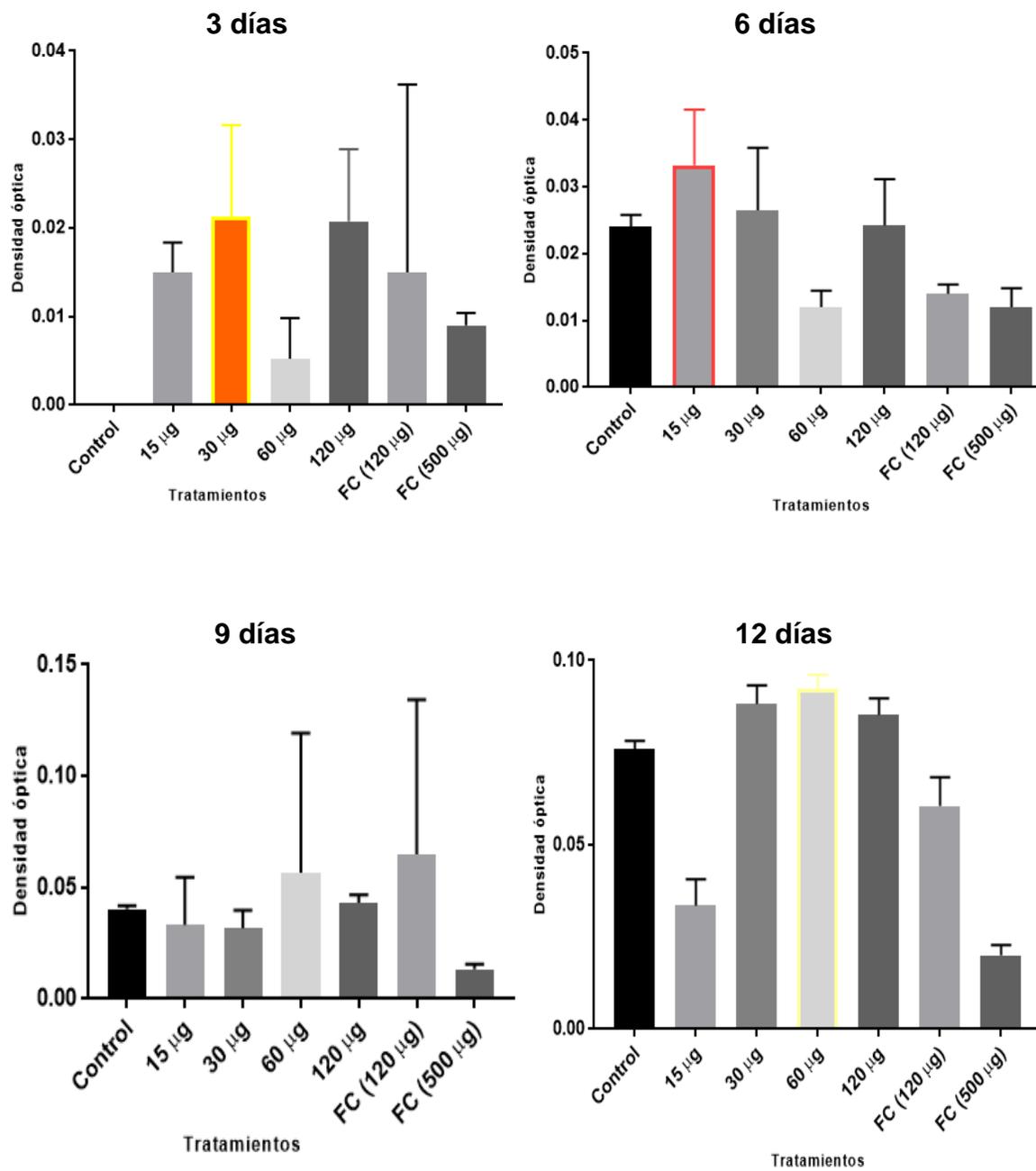
XI. ANEXO 3

Cuadro 8. Promedio y desviación estándar del conteo de bacterias totales en cámara de Neubauer con proteína RipA, RpfB Y RipA + RpfB con bacterias activas y dormantes

Proteína	µg totales	Promedio conteo en cámara de Neubauer	Desviación estándar	P
RipA bacterias activas	15	2360000	1213809	0.0032
	30	6015000	7373056	
	60	537500	125000	
	120	912500	93941	
	FC	300000	127279	
	Control	400000	14142	
RipA bacterias dormantes	15	2167500	1162852	0.0042
	30	5297500	7813792	
	60	680000	185652	
	120	917500	85000	
	FC	385000	7071	
	Control	395000	7071	
RpfB bacterias activas	15	1807500	228235	0.0014
	30	2147500	194143	
	60	1420000	128840	
	120	1037500	47871	
	FC	435000	21213	
	Control	360000	0	
RpfB bacterias dormantes	15	1345000	594446	0.0090
	30	1172500	624786	
	60	2750000	525991	
	120	995000	106614	
	FC	925000	106066	
	Control	345000	63639	
RipA + RpfB bacterias activas	15	14612500	8304855	0.0110
	30	31522500	27667430	
	60	49712500	40588019	
	120	15215000	22227690	
	FC	370000	113137	
	Control	500000	70710	
RipA + RpfB bacterias dormantes	15	46497500	46352670	0.0071
	30	13457500	6554430	
	60	4312500	3492939	
	120	13100000	6565566	
	FC	590000	113137	
	Control	365000	49497	

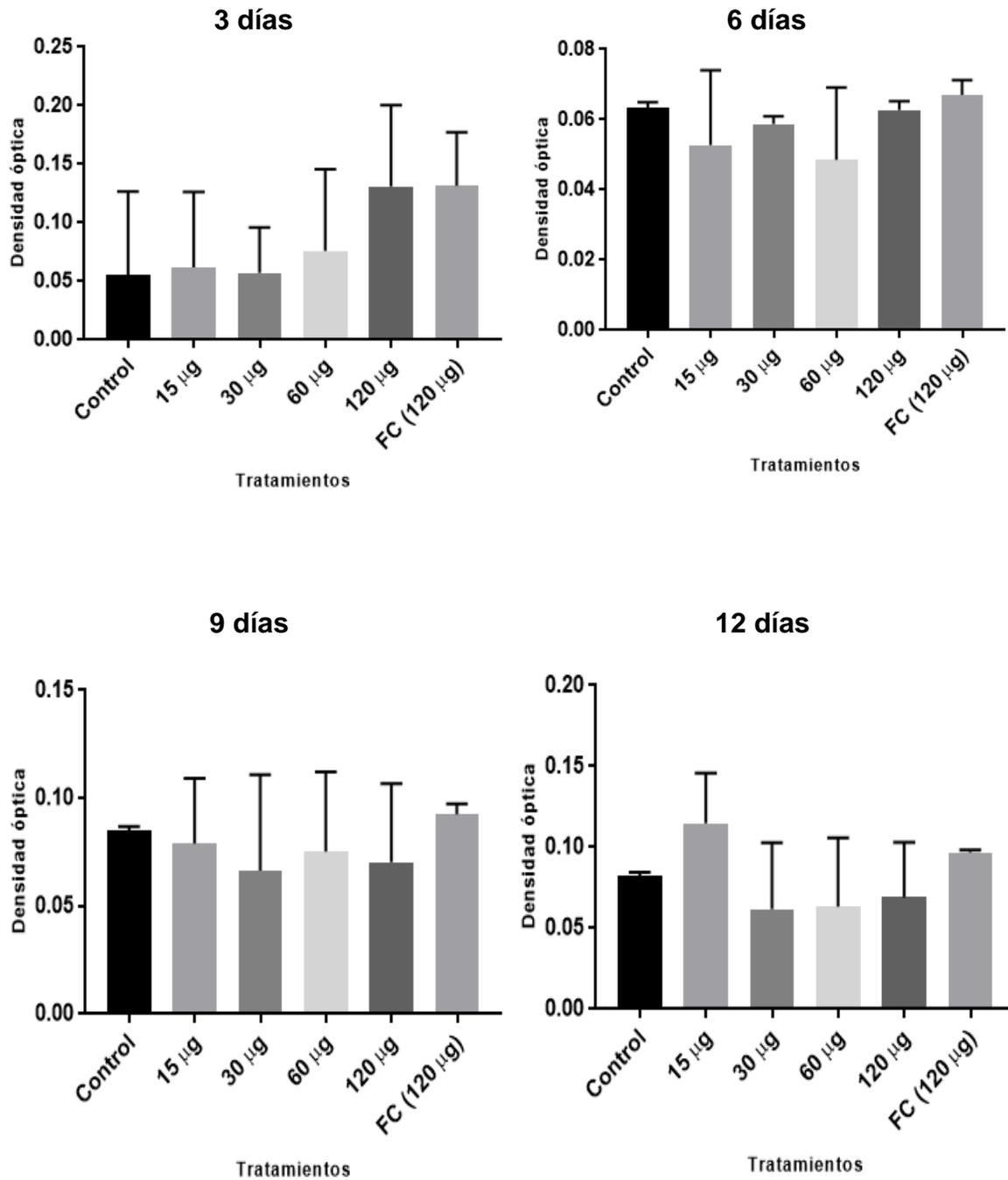
XII. ANEXO 4

Figura 20. Densidad óptica por día de muestreo de RipA con bacterias activas.



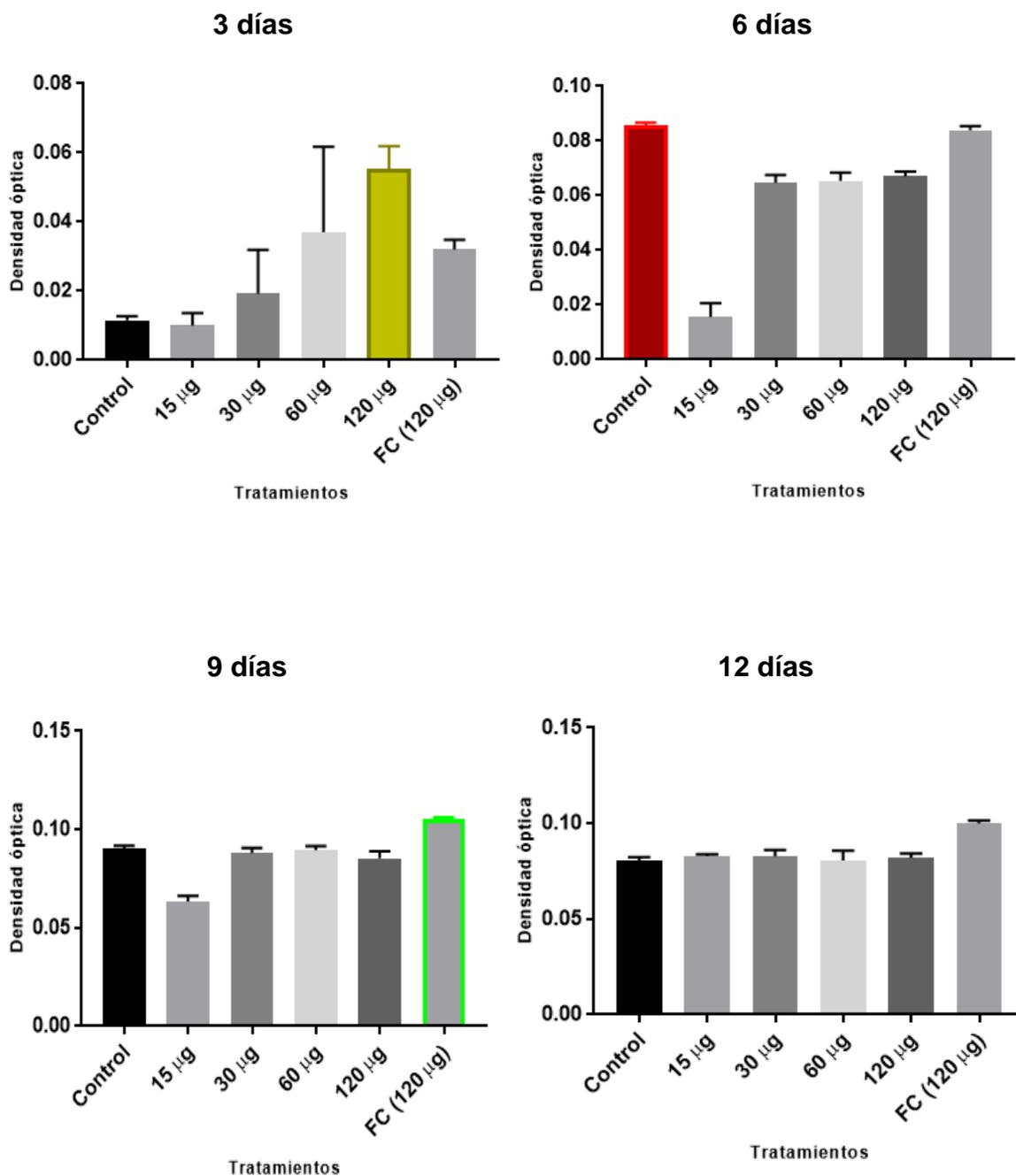
XIII. ANEXO 5

Figura 21. Densidad óptica por día de muestreo de RipA con bacterias dormantes.



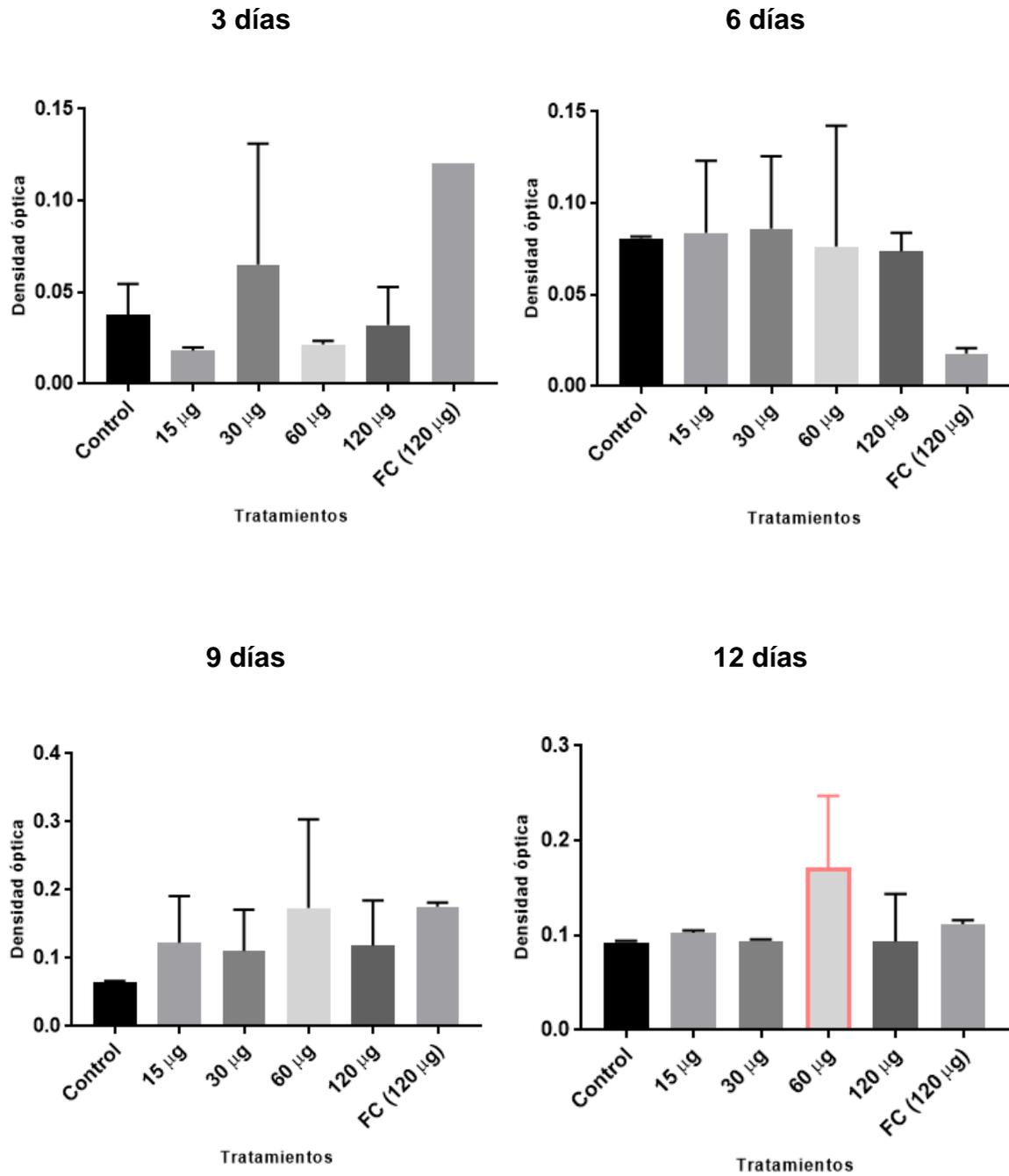
XIV. ANEXO 6

Figura 22. Densidad óptica por día de muestreo de RpfB con bacterias activas.



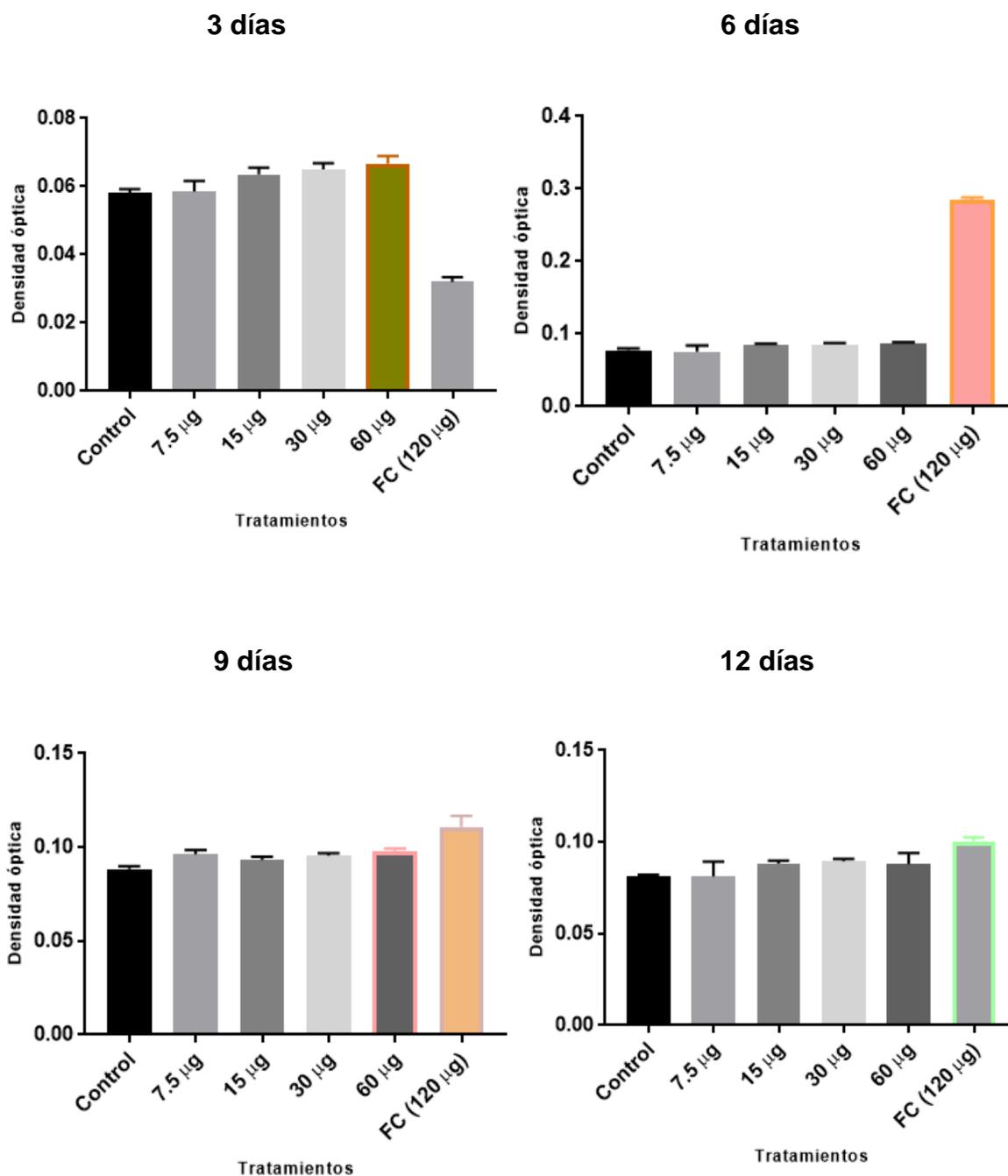
XV. ANEXO 7

Figura 23. Densidad óptica por día de muestreo de RpfB con bacterias dormantes.



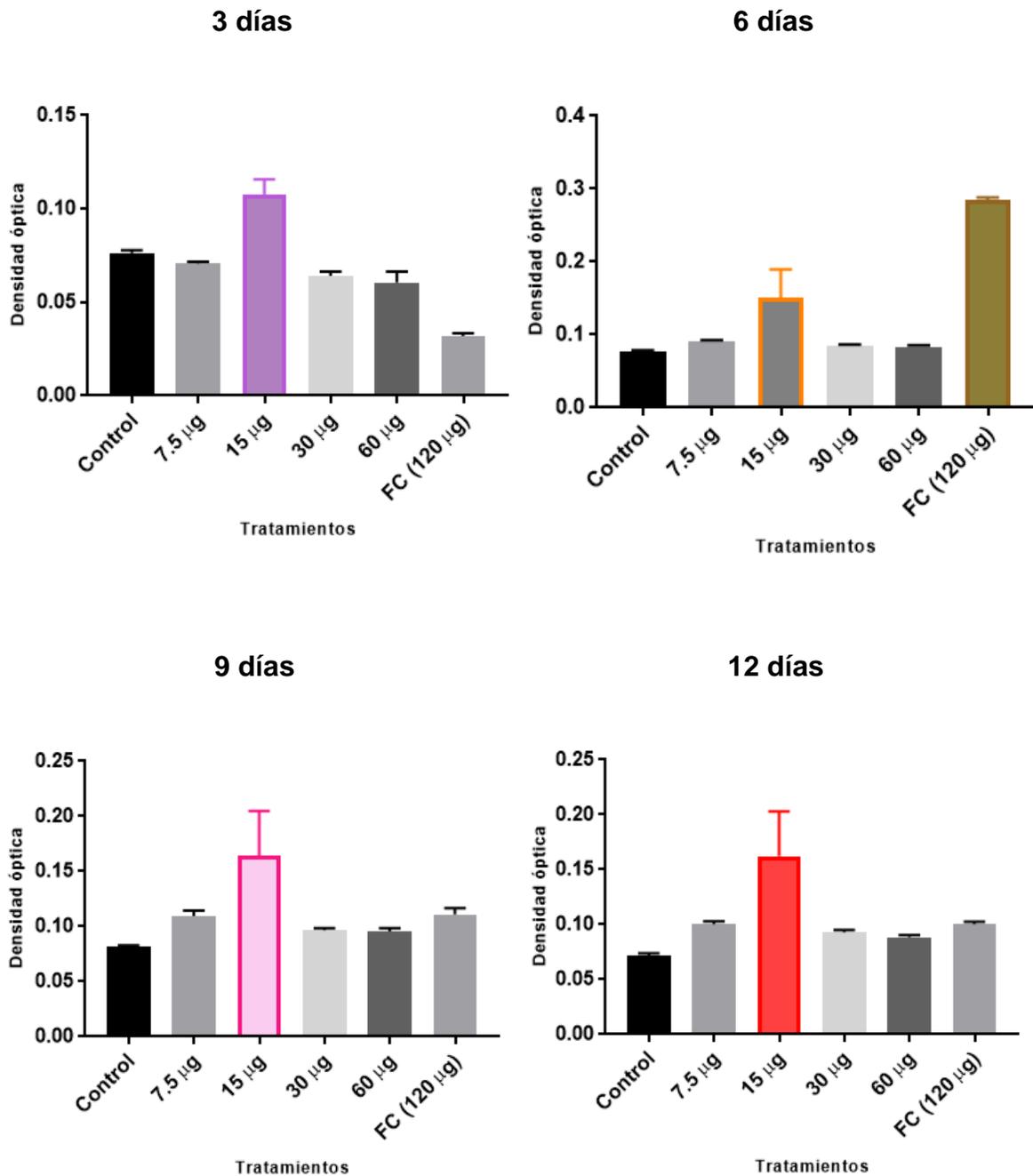
XVI. ANEXO 8

Figura 24. Densidad óptica por día de muestreo de RipA + RpfB con bacterias activas.



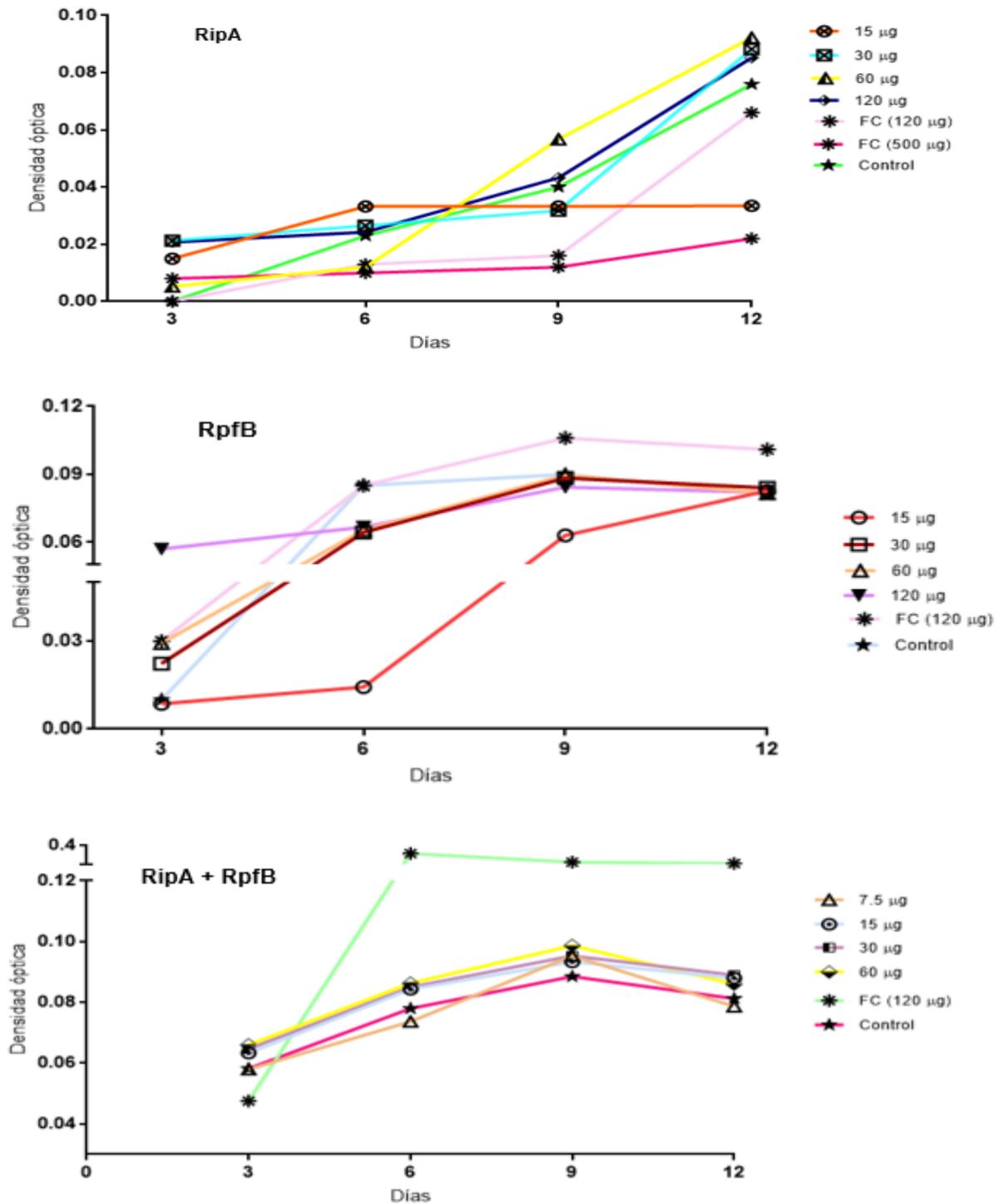
XVII. ANEXO 9

Figura 25. Densidad óptica por día de muestreo de RipA + RpfB con bacterias dormantes.



XVIII. ANEXO 10

Figura 26. Espectrofotometría a los 12 días de muestreo de RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias activas.



XIX. ANEXO 11

Figura 27. Espectrofotometría a los 12 días de muestreo de RipA, RpfB y RipA + RpfB con bacterias dormantes.

