

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**ANÁLISIS GENÓMICO DE *Mycobacterium bovis* DE
AISLADO DE HUMANOS Y GANADO BOVINO EN
BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

SARAI ESTRELLA SANDOVAL AZUARA

ENSENADA, B.C., MÉXICO

AGOSTO 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS GENÓMICO DE *Mycobacterium bovis* DE AISLADO DE HUMANOS
Y GANADO BOVINO EN BAJA CALIFORNIA

TESIS


QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

SARAI ESTRELLA SANDOVAL AZUARA

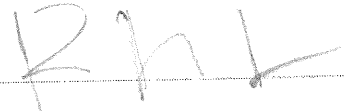
Aprobada por:



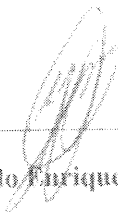
Dra. Raquel Muñiz Salazar



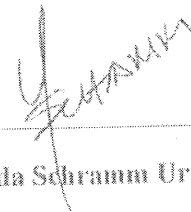
Dr. Gilberto López Valencia



Dr. Roberto Zenteno Cuevas



Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto



Dra. Yolanda Schramm Urrutia

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su infinito amor, sus planes y tiempos perfectos en mi vida.

A mis padres, María de Jesús Azuara Jaramillo y Leobardo Wilfrido Sandoval, por todo su amor, apoyo, guía y disciplina que me han brindado y enseñado para poder lograr esta meta.

A mi familia, Jorge Alberto Alvidrez Delgado y Evan Ariel Alvidrez Sandoval, por su comprensión amor y apoyo, para poder obtener ese logro.

A mi directora, Dra. Raquel Muñoz Salazar, por su guía, apoyo, consejos, enseñanzas y amistad que me ha brindado durante todo el proceso de esta investigación.

A mi querido maestro y amigo Dr. Gilberto López Valencia por su apoyo, amistad, guía, por siempre estar al pendiente de la investigación y de mi vida.

A mis sinodales, Dra. Yolanda Schram Urrutia, Dr. Roberto Zenteno Cuevas, Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto por todo su apoyo y por dedicar parte de su valioso tiempo a la revisión de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la UABC Nelva L. Victoria Cota, M. C. Norma C. Martínez Cisneros, M. C. Rosa Alejandra García Ortiz por su apoyo técnico.

Al los Médicos Marco Antonio Nueñez Bautista y Ricardo Perea Jacobo, por su colaboración en la investigación, amistad y apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la UABC por su apoyo, amistad, consejos y por hacer de mi estancia en el laboratorio un rato agradable.

A CONACYT por otorgarme la beca No. 201092 que me permitió dedicar tiempo completo al desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California.

Este proyecto fue financiado por:

PROMEPA- Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos 2013, Proyecto No. 10672

“Epidemiología molecular de tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en humanos y ganado
bovino en Baja California”

CONACyT-Ciencia Básica Proyecto No. 166624

“Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en la frontera Noroeste México-
Estados Unidos”.

INDICE.....	IV
AGRADECIMIENTOS	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
ANTECEDENTES GENERALES.....	9
Transmisión de TBB	10
Transmisión de TBB de bovino a humano.....	11
Tuberculosis bovina en México	14
Prevalencia de TBB en América Latina y el Caribe	15
Epidemiología de la TBB en el mundo.....	16
Patogenia.....	19
Proceso primario	19
Proceso post primario.....	20
Diagnóstico de TBB	22
Prueba tuberculina.....	22
Prueba caudal	24
Prueba cervical comparativa	25
Prueba cervical simple	26
Diagnóstico histopatológico.....	26
Cultivo microbiológico	28
INF –Gamma Interferón.....	28
Diagnostico de TBB en humanos.....	29
Características genéticas de <i>M. bovis AF2122/97</i>	30
Comparación de las características genéticas entre <i>M. tuberculosis H37Rv</i> y <i>M. bovis AF2122/97</i>	31
Identificación molecular de la especie	32
Caracterización molecular del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
RFLP-IS6110.	35
Espoligotipado.....	35
MIRU-VNTR	38
Figura 6: Esquema del cromosoma <i>M. bovis</i> con loci VNTR	36
Secuenciación de genoma completo	37
Secuenciación de genoma completo mediante pirosecuenciación.....	39
Seguimiento de la transmisión y definición de brotes SNPs.....	40
La tasa de mutación del CMT.....	41
La filogenia y evolución del CMT.....	42
<i>Resistencia a fármacos</i>	43
Mutaciones compensatorias.....	44

Capítulo I Diagnóstico <i>postmortem</i>, en lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastros de Baja California	49
RESUMEN.....	50
Introducción	51
Objetivo general.....	54
Objetivos específicos	54
Material y métodos.....	55
Colecta de muestras.....	55
Análisis histopatológico	55
Aislados microbiológicos.....	56
Identificación molecular de micobacterias.....	56
Colecta de muestras.....	57
Análisis y distribución histopatológica de los casos positivos.....	57
Aislados microbiológicos e identificación molecular	1
DISCUSIÓN	48
Capítulo II.....
Caracterización molecular de <i>Mycobacterium bovis</i> aislados de humanos y ganado bovino en Baja California, México, mediante Secuenciación de Genoma Completo.....	53
Resumen.....	54
Introducción	55
Objetivo General	58
Materiales y métodos	59
Declaración de Ética	59
Población de estudio y obtención de muestras.....	60
Muestras de aislados microbiológicos de humanos	60
Muestras de ganado bovino.....	60
Análisis histopatológico	61
Aislados microbiológicos.....	62
<i>Ganado bovino</i>	62
<i>Humanos</i>	62
Análisis genético	63
Extracción de ADN.....	63
Identificación molecular de <i>M. bovis</i>	63
Secuenciación de Genoma Completo.....	64
Análisis bioinformático.....	65
RESULTADOS.....	68
Análisis histopatológico.....	68
Aislados microbiológicos.....	71

Ganado bovino	71
Humanos.....	71
Secuenciación de genoma completo	71
Espoligotipado.....	72
Discusión	77
Capítulo III.....	73
Farmacorresistencia molecular en cepas de <i>M. bovis</i> en aislados microbiológicos de humanos y de ganado bovino en Baja California, México	73
Introducción	74
Mecanismos moleculares generadores de farmacorresistencia a fármacos de primera línea.....	78
Pirazinamida (PZA)	78
Rifampicina (RIF).....	79
Isoniacida (INH).....	80
Etambutol (E).....	82
Estreptomycin (STR).....	82
Mecanismos moleculares generadores de farmacorresistencia a fármacos de segunda línea.....	84
Kanamicina (KM), Amikacina (AMK) y Capreomicina (CPM)	84
Fluorquinolonas (FQ).....	85
Bombas de eflujo.....	86
Objetivos.....	89
Material y Métodos	90
Declaración de Ética	90
Población de estudio y obtención de muestras.....	91
Muestras de aislados microbiológicos de humanos	91
Muestras de ganado bovino.....	91
Aislados microbiológicos.....	92
<i>Ganado bovino</i>	92
<i>Humanos</i>	93
Análisis genético	93
Extracción de ADN.....	93
Identificación molecular de <i>M. bovis</i>	94
Secuenciación de Genoma Completo.....	95
Ensamble y alineamiento	95
Análisis de mutaciones.....	96
Resultados.....	104
Mutaciones identificadas en comparación con la cepa <i>M. tuberculosis H37Rv</i> y <i>M. bovis AF2122/97</i>	105

Haplotipos de mutaciones	111
<i>Frecuencia y relación de los Haplotipos con espoligotipos</i>	124
Haplotipos y perfil de resistencia molecular	132
DISCUSIÓN	135
CONCLUSIONES	
GENERALES	138
RECOMENDACIONES	140

Lista de Figuras

Figura 1. Situación actual de Tuberculosis Bovina, Octubre de 2016.....	13
Figura 2. Representación circular del genoma de <i>M. bovis</i>	29
Figura 3. Esquema de las principales diferencias en la pared celular y variaciones antigénicas entre <i>M. bovis</i> AF2122/97 y <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	29
Figura 4. Representación del cromosoma del CMT con las IS6110.....	32
Figura 5. Estructura del locus DR en el genoma micobacteriano.....	34
Figura 6. Esquema del cromosoma <i>M. bovis</i> con loci VNTR.....	37
Figura 7. Identificación molecular de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> en ganado de carne y leche de acuerdo a la ciudad de procedencia en Baja California.....	58
Figura 8. Frecuencia de patrones de espigotipo de <i>Mycobacterium bovis</i> en Ganado humano.....	73
Figura 9. Árbol filogenético generado con RAxML de Secuencias de Genoma Completo.....	76
Figura 10. Frecuencia y distribución de los haplotipos, en ganado y humanos.....	127

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Agrupación de países de acuerdo a la prevalencia de reactores a tuberculina.....	15
Tabla II. Lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino recolectadas en dos rastros de Baja California.....	61
Tabla III. Diagnóstico histopatológico (Hematoxilina-Eosina) de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina en ganado lechero y de carne.....	62
Tabla IV. Diagnóstico histopatológico, cultivo microbiológico, e identificación molecular en ganado lechero y de carne.....	63
Tabla V. Lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino recolectadas en dos rastros de Baja California.....	69
Tabla VI. Diagnóstico histopatológico de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina.....	70
Tabla VII. Frecuencias de espoligotipos de <i>Mycobacterium bovis</i> en casos de ganado y humanos reportados en esta investigación. Distribución en México y el mundo de todos los espoligotipos en este estudio (n=172 aislados) comparado con la base de datos www.mbovis.org y otros reportes.....	81
Tabla VIII. <i>Mycobacterium bovis</i> en ganado de México.....	83
Tabla IX. <i>Mycobacterium bovis</i> en casos de humanos, reportados en México...85	
Tabla X. Fármacos y genes asociados a farmacorresistencia a drogas de primera línea y mutaciones compensatorias.....	101
Tabla XI. Fármacos y genes asociados a farmacorresistencia a drogas de segunda línea	102
Tabla XII. Genes de bombas de eflujo asociados a farmacorresistencia.....	103
Tabla XIII. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea en comparación con la cepa de referencia <i>M. tuberculosis H37Rv</i> y <i>M. bovis AF2122/97</i>	110
Tabla XIV. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea en comparación con la cepa de referencia <i>M. tuberculosis H37Rv</i> y <i>M. bovis AF2122/97</i>	114
Tabla XV. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a bombas de eflujo en comparación con la cepa de referencia <i>M. tuberculosis H37Rv</i> y <i>M.bovis AF2122/97</i>	116
Tabla XVI. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea.....	117
Tabla XVII. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea.....	121
Tabla XVIII. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a Bombas de eflujo.....	122
Tabla XIX. Número de haplotipos y mutaciones observadas en comparación con las cepas de referencia <i>M.tuberculosis H37Rv</i> y <i>M.bovis AF2122/97</i>	129

INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), los patógenos reconocidos como los más importantes son *M. tuberculosis* causante de la tuberculosis (TB) en humanos y *M. bovis* causante de tuberculosis bovina (TBB). La TBB es una enfermedad zoonótica capaz de afectar a cualquier mamífero y se ha descrito como la segunda causa de TB en el ser humano, en realidad existe una relación cruzada de infección, TB en humanos por *M. tuberculosis*, y *M. bovis*, y TBB consecutiva a *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Sin embargo, es menos frecuente encontrar *M. tuberculosis* en ganado bovino que *M. bovis* en humanos (Pérez-Guerrero et al. 2008). La TBB en humanos puede propagarse mediante el contacto directo con un animal enfermo y/o la ingestión de productos lácteos sin pasteurizar (Cosivi et al. 1998; Cousins 2001; Ayele et al. 2004).

En México, la TBB es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, debido a su alta prevalencia, 16% en bovinos productores de leche (SAGARPA 2011b) provocando mermas económicas de 40 millones de pesos diarios por concepto de detección de la enfermedad en el ganado (SAGARPA 2011b). De la misma manera, se puntualiza una disminución del 20% en la producción de leche y carne, y una disminución del 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños (SAGARPA 2011a). La restricción en la venta y/o exportación de carne de ganado bovino en pie hacia los EUA y sus productos amenaza la comercialización generando pérdidas de 450 millones de dólares anuales (SAGARPA 2011b).

Baja California (B.C) es el estado que le corresponde la sexta posición en cuanto a frecuencia (4.3 %) y prevalencia (0.46 - 4.03 %,) de TBB EN México (SENASICA 2013), sin embargo se han descrito regiones en Baja California con hasta un 40% de prevalencia de la enfermedad en ganado bovino, (Lopez-Valencia et al. 2010). Además es el estado mexicano fronterizo terrestre más transitado en el mundo, con un estimado de 50 millones de cruces humanos legales por año, por lo que es una región altamente susceptible al movimiento de patógenos. Por esto se piensa que B.C. es el estado mexicano con la mayor incidencia de TB en seres humanos y posee una de las más altas prevalencias de TBB reportadas en el país (Secretaria de Salud México 2015). En el 2013 se reportó en B.C una frecuencia de TBB en humanos del 4.5% (27/600), en donde tres de estas cepas resultaron polirresistentes a Pirazinamida (P), Isoniazida (H), Etambutol (E) y Rifampicina (R) (Z + H + E, Z + E y Z + R); el resto sólo mostró resistencia a Z (Laniado-Laborín et al. 2014).

El desarrollo de resistencia a los medicamentos antituberculosos durante el tratamiento, conocido como la resistencia adquirida, puede conducir a la aparición de cepas resistentes y en consecuencia desfavorables resultados clínicos (Seung et al. 2004). La resistencia adquirida se asocia con un inadecuado uso del régimen de antibióticos o un tratamiento incompleto (Chiang et al. 2010).

Las técnicas moleculares son una valiosa herramienta de análisis para la TB y la TBB ya que mediante el genotipado se puede diferenciar entre cepas de una misma especie,

Estas técnicas han sido empleadas en numerosos estudios de infecciones nosocomiales, brotes institucionales y transmisión de TB multirresistente a fármacos. También se han utilizado en numerosos estudios genético poblacionales en áreas geográficas con baja, media y alta incidencia de TB y TBB, empleando técnicas convencionales de epidemiología unidas al análisis de genotipado en donde algunos reportes han encontrado elevadas proporciones de TB transmitida recientemente sin sospecha previa por los métodos epidemiológicos convencionales. Además es posible rastrear el origen de las cepas infectantes cuando la información epidemiológica no está disponible (Zumárraga et al. 2013).

Es de importancia resaltar que es trascendental la identificación y la diferenciación entre estas especies, especialmente en países donde la TBB es endémica y se presenta la transmisión de *M. bovis* entre animales o sus productos y humanos, ya que *M. bovis* es intrínsecamente resistente a pirazinamida (Z), fármaco dentro del régimen estándar para *M. tuberculosis*. Además, se ha descrito que a causa de esta especie existen 2.5% más probabilidades de morir durante el tratamiento, (Grange 2001; Allix-Béguec et al. 2008; Rodwell et al. 2010; Müller et al. 2013; Ortiz Muñoz 2015).

Por otro lado en publicaciones recientes, han demostrado el valor del análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido SNPs utilizando la secuenciación del genoma completo (SGC) para rastrear tuberculosis en humanos y bovinos e identificar la fuente de brotes locales (Glaser et al. 2016; Kamath et al. 2016). El notable poder discriminatorio de los SNPs es de utilidad para el control local de la enfermedad, y pueden utilizarse para

establecer y evaluar la política para el control de la Tuberculosis tanto en humanos como en ganado bovino a nivel nacional e internacional (Kao R et al. 2016; Crispell et al. 2017).

La importancia de la TBB radica en sus repercusiones en salud pública ya que la incidencia de TBB en humanos y en ganado podrían estar subestimadas y en algunos casos incluso ignoradas, principalmente en países en vías de desarrollo como lo es México (Laniado-Laborín et al. 2014). Los principales problemas que impiden comprender la verdadera carga de esta enfermedad en los humanos y en el ganado bovino son la ausencia de vigilancia sistemática para *M. bovis*, derivado de falta de recursos económicos, la ignorancia de la incidencia y prevalencia de TBB en zonas donde se conoce que la enfermedad es endémica, la incapacidad y falta de procedimientos comúnmente utilizados para diagnosticar la TB y la TBB, así como la identificación y diferenciación de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*, con el resultado de suponer que todos los casos de TB son causados por *M. tuberculosis* y todos los casos de TBB son debidos a *M. bovis*. Por lo tanto, los datos disponibles no son representativos de la enfermedad tanto en humanos como en el ganado (Thoen et al. 2006; Pérez-Lago et al. 2014). Además, se desconocen las características genéticas de las cepas que circulan en la población humana y bovina por lo que hasta el momento no se ha podido esclarecer si las cepas que circulan en la población humana tienen origen bovino, cuál es la relación genética de las cepas que circulan en el estado, y cuál es el perfil de resistencia a fármacos que estas cepas poseen.

Por todo lo anteriormente mencionado se utilizó la Secuenciación de Genoma Completo para realizar la caracterización genética mediante espoligotipado *in silico* y el

análisis de SNPs para determinar la relación genética entre aislados de *M. bovis* provenientes de humanos y ganado en Baja California.

ANTECEDENTES GENERALES

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa de curso cónico, que se distribuye mundialmente, la cual es causada por el complejo de bacterias *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), el cual comprende a las especies de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*, y puede afectar tanto a humanos como a animales (Zhang et al. 2010). La infección por *M. bovis* se ha descrito en varias especies domésticas y en animales salvajes, por lo que se considera que todos los mamíferos terrestres son susceptibles a la infección por esta micobacteria (Morris et al. 1994; Cousins 2001).

La TBB es una enfermedad infecto-contagiosa, crónica, la cual se caracteriza por la formación de granulomas caseosos, con tendencia a la calcificación, no vascularizados; según su tamaño y ubicación causa diferentes signologías, como por ejemplo, emaciación progresiva, fiebre fluctuante, debilidad e inapetencia (Lüchter 2004). Afecta principalmente al aparato respiratorio, presentándose granulomas en pulmón, ganglios linfáticos, y en algunos otros órganos que con frecuencia son causa de decomiso y desecho de las canales en el rastro. Por ello, la importancia de la TBB radica en las pérdidas económicas que ocasiona a la ganadería, principalmente como barrera no arancelaria para la exportación de ganado y del riesgo que representa para la salud pública (García 2005).

Transmisión de TBB

En el ganado la infección por *M. bovis* puede ser adquirida por la inhalación de aerosol o partículas de polvo contaminados, considerando la vía respiratoria la forma de infección más frecuente en bovinos y otras especies animales, también puede ser adquirida por la ingestión de alimentos, agua contaminada y en los terneros al alimentarse de calostro o leche contaminada (Menzies 2000). Las vías menos frecuentes de transmisión son la cutánea, congénita y genital (Neill 1994). Existen numerosas rutas de infección en el ganado las cuales se encuentran influenciadas por factores como la edad, el sistema inmune de cada organismo, el ambiente y el clima. Estudios epidemiológicos sugieren que los factores de riesgo más importantes en la ocurrencia y diseminación de la TBB dentro de un hato, son el número de animales infectados, la cantidad de animales susceptibles y las medidas tomadas para prevenir la diseminación de la TBB. A pesar de que no todos los animales infectados transmiten la enfermedad, aquellos con cuadros respiratorios o con mastitis tuberculosa son la principal fuente de infección; en la mayoría de los casos *M. bovis* puede estar presente en orina, secreciones genitales, semen o deposiciones, lo que facilita su transmisión (Cousins 2001; Abalos & Retamal 2004).

Transmisión de TBB de bovino a humano

Mycobacterium tuberculosis ocasiona la TB en el humano, pero también *M. bovis* el cual se considera como el segundo causante de esta enfermedad, presenta la misma forma clínica y lesiones patológicas (Baker et al. 2006). Algunos autores consideran que entre el 3.1 % y el 16 % de los casos de TB humana a nivel mundial pueden deberse a *M.bovis* (Müller et al. 2013).

En humanos la transmisión de TBB, ocurre cuando el microorganismo es ingerido, inhalado o por la manipulación de tejido infectado teniendo alguna herida en la piel. La ingestión de alimentos infectados como la carne mal cocida y leche sin pasteurizar, o derivados de ésta se considera la vía de infección principal entre el ganado y los seres humanos, ocasionando lesiones extrapulmonares, por ello la implementación de la pasteurización de la leche desde hace muchos años ha constituido una rutina para eliminar al agente etiológico en todo el mundo (Abalos & Retamal 2004; Biet et al. 2005; Esteban et al. 2005; de la Rúa-Domenech 2006). Sin embargo, en México el 28% de la leche se comercializa sin pasteurizar para la preparación de quesos frescos principalmente (SAGARPA 2005).

La infección por vía aérea ha sido descrita por contacto directo con el ganado infectado, por lo que la población en riesgo a la infección por *M. bovis* por exposición ocupacional son trabajadores de establos, rastros, cazadores, veterinarios, adicionalmente deben incluirse a las personas que consumen leche no pasteurizada, pacientes con VIH-SIDA y sujetos comprometidos inmunológicamente. (Ayele et al. 2004; Biet et al. 2005; de Kantor & Ritacco 2006; Thoen et al. 2006; Pérez-Lago et al. 2014). Además se han descrito

casos de la transmisión de *M. bovis* de persona a persona (Evans et al. 2007; Laniado-Laborín et al. 2014).

Tuberculosis bovina en México

En México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo, sin considerar la disminución del 17% en la producción de leche, la reducción en la ganancia de peso, en la tasa de conversión alimenticia hasta en un 15%, y de la fertilidad en un 6% (SAGARPA 2011a). Por otra parte, la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas de 450 millones de dólares anuales (SAGARPA 2011b).

Para controlar y erradicar la TBB en nuestro país, en 1996 se publicó la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO- 1995), Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*M. bovis*) que con recursos económicos del Gobierno Federal, Estatal y de los productores ha fortalecido la vigilancia epidemiológica y los programas para disminuir el riesgo de la infección en el ganado bovino. Después de haber realizado pruebas de tuberculina a la población bovina en el país, en el 66% de la superficie hay una prevalencia menor del 0.5%, lo que representa 238,067 hatos y 14.5 millones de cabezas de ganado; en el resto la prevalencia promedio es de 2.05%, excepto en las zonas lecheras que se considera del 16.5% (Figura 1, SAGARPA 2011b). Los objetivos de la Campaña

consideran que la erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar el riesgo hacia la población humana, la mejora de la productividad de los bovinos, el evitar las pérdidas económicas y las restricciones a la movilización de animales, a nivel nacional e internacional (SAGARPA 2011b).

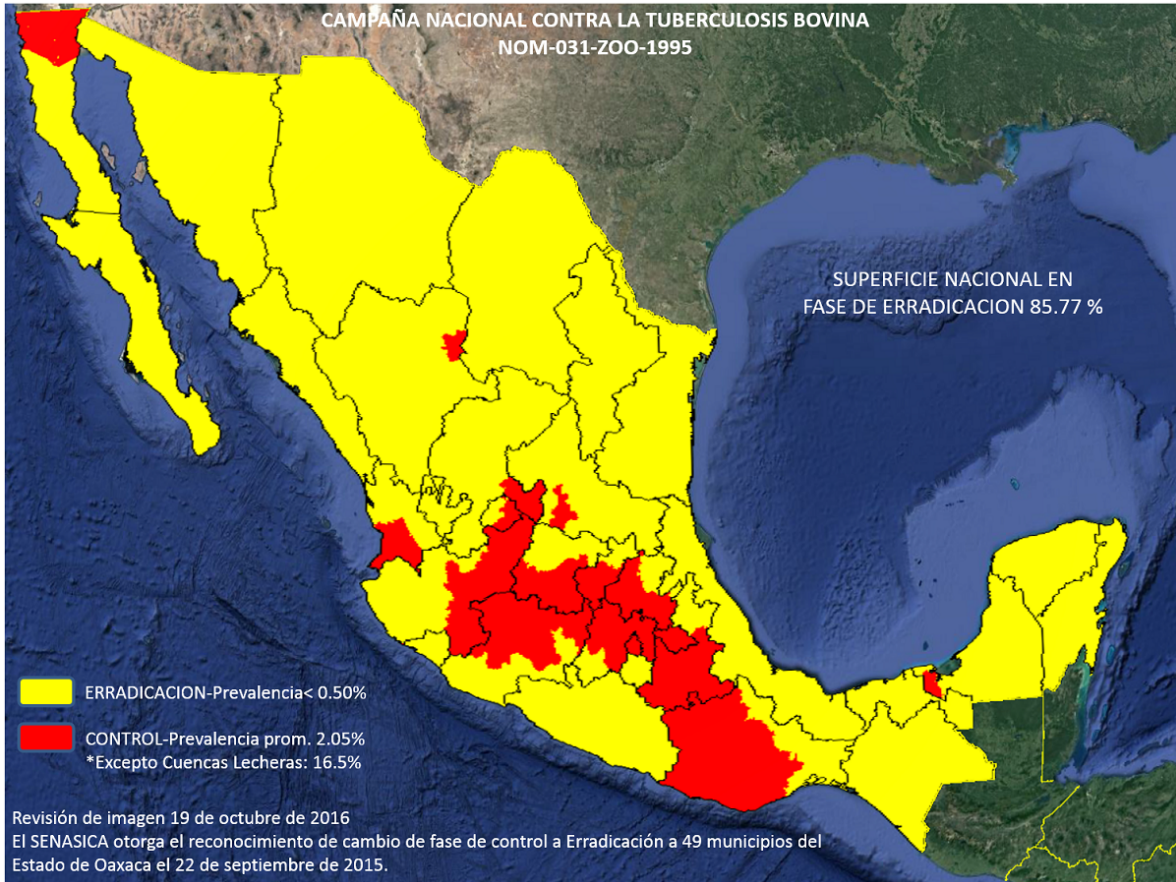


Figura 1. Situación actual de Tuberculosis Bovina, Octubre de 2011. Se ha reconocido el 85.77% del territorio nacional en fase de erradicación (prevalencia menor al 0.5%).

Prevalencia de TBB en América Latina y el Caribe

Existe una variación considerable en la prevalencia y la vigilancia de la TBB en América Latina y el Caribe. La población de bovinos en el Continente Americano es de 476 millones de cabezas correspondiendo el 70% a Argentina, Brasil, Colombia, Chile, México, Paraguay, Perú y Uruguay, Los países se agrupan de acuerdo a la prevalencia de reactores a tuberculina: 1) más abajo de 0.1% o nada, 2) entre 0.1% y 1%, más alto de 1% o desconocido (Tabla I, de Kantor & Ritacco 2006).

Tabla I. Agrupación de países de acuerdo a la prevalencia de reactores a tuberculina

Prevalencia	Rango	Países	Producción de ganado (millones de cabezas)
Baja	< 0.1%	Panamá, Honduras y Belice en América Central. Colombia, Surinam, Uruguay y Venezuela	61.6
Media	0.1% - 1%	México, Paraguay, República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica y El Salvador	47.4
Alta	> 1%	Haití, Guatemala, Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Ecuador, Perú y Guyana,	265.1

(de Kantor & Ritacco 2006).

Aproximadamente el 70% del ganado en América Latina se encuentra en áreas con alta prevalencia de la enfermedad, y el 17% en áreas virtualmente libres de TB (de Kantor & Ritacco 2006). A pesar de los programas de control y erradicación que se han implementado en muchos países, en América Latina, el 24% de la población bovina no está sujeta a ningún control de la TBB (Abalos & Retamal 2004).

Aunque en la mayoría de los países desarrollados la enfermedad está bajo control, la persistencia de la infección en animales salvajes, como el tejón en el Reino Unido, el venado de cola blanca en ciertas partes de los Estados Unidos o la chinchilla de Adelaida en Nueva Zelanda (Murphree 2011), complica el objetivo de lograr su completa eliminación.

Epidemiología de la TBB en el mundo

La TBB es una zoonosis que produce grandes pérdidas económicas en muchos países, constituye un grave problema de salud pública en los países en desarrollo. Su epidemiología resulta muy compleja debido que se trata de una bacteria de crecimiento lento, con dificultad para aislarla y para diferenciarla clínicamente y fenotípicamente causando esto una subestimación de la enfermedad. La cual tiene la característica de permanecer de forma latente y afectar a diversas especies animales, incluyendo a la fauna silvestre que funge como reservorio.

La TBB está presente en el mundo entero, diferentes estudios coinciden en que la prevalencia más elevada se registra en buena parte del territorio de África, ciertas partes de

Asia y las Américas. En muchos países desarrollados se ha reducido o eliminado la TBB. Sin embargo, en la fauna silvestre de Canadá, el Reino Unido, los Estados Unidos y Nueva Zelanda subsisten importantes reservorios de infección (Torgerson 2010).

En la última década, una nueva tendencia en el aumento de la incidencia de casos de *M. bovis* en humanos se han dado en diferentes partes del mundo (Pérez-Guerrero et al. 2008; Rodwell et al. 2008; Cicero et al. 2009). Con base en estudios realizados en África, la proporción de casos es de 2.8%, mientras que en Etiopía, Nigeria y Tanzania, la proporción de casos varía de 17 % a 30 % (Kazwala et al. 2001; Mfinanga et al. 2004; Mawak 2006; Shitaye 2007; Alemayehu 2008; Cicero et al. 2009; Fetene et al. 2011).

Estudios realizados en Austria, Alemania, Grecia y España identificaron a *M. caprae* como agente causal de TB en humanos, además de *M. bovis* (Prodingler et al. 2002; Kubica et al. 2003; Neonakis et al. 2007; Rodríguez et al. 2009). Tres de cinco estudios realizados en entornos con baja incidencia de TB la Unión Europea informaron proporciones de *M. bovis* en humanos >10% (Ammon & Makela 2010). En otro estudio hospitalario en Alemania, mediante el uso de técnicas moleculares se identificaron cuatro casos de *M. bovis* entre 19 casos de tuberculosis (Zink & Nerlich 2004). Un estudio realizado en España se caracterizó la transmisión de una cepa resistente a múltiples fármacos de *M. bovis* como la causa de brotes de TB nosocomiales que explicaron el 12.2 % de las cepas de tuberculosis resistentes a múltiples fármacos (Samper et al. 2005).

En el Reino Unido se reportó un aumento de la TBB en el ganado bovino por lo que se investigó la infección por *M. bovis* en humanos y la transmisión, mediante la utilización de 15 MIRU- VNTR durante el periodo 2005 -2008. De un total de 129 casos de infección por *M. bovis* en humanos, la mayoría de los pacientes (73 %), habían nacido antes de 1960, previo a la introducción generalizada de la pasteurización, 83% eran de raza blanca, y 73 % nacieron en el Reino Unido. Se obtuvieron datos de tipificación de 102 pacientes (79 %). Se obtuvieron 31/69 perfiles completos MIRU-VNTR formado ocho grupos distintos. La proporción global de agrupación fue del 33 %. El grupo más grande, que comprende 12 casos, presentaron un mismo perfil MIRU-VNTR: 755 532 222 415 321 cepa del brote West Midlands reportado previamente. Este grupo presentó características heterogéneas, transmisión zoonóticas reciente, transmisión de humano a humano, y reactivación de una enfermedad latente. Otros siete grupos, más pequeños identificados se debían a reactivación de la enfermedad, en este estudio fue predominante la presencia de casos por reactivación (Mandal 2011).

En México se reportó una proporción del 26.2% (306/1,165) de aislados de *M. bovis* en humanos (Bobadilla-del Valle et al. 2015), más alto que lo reportado en otros estudios realizados en hospitales de México (<1%). (Lopez-Alvarez et al. 2010; Cordova et al. 2012), y en hospitales de América (0.4%). Adicionalmente existen reportes de cepas de esta especie resistentes a isoniazida, rifampicina y estreptomycinina en donde su impacto ha sido dramático. En Baja California se realizó un estudio en 323 aislados clínicos de pacientes diagnosticados con TB en el periodo Octubre 2009 a Abril 2011, en donde el 2% de las muestras clínicas fueron identificadas como *M.bovis*, estos presentaron TB pulmonar, lo

que sugiere que la transmisión se dio por vía aérea. Se realizó la caracterización genética mediante la utilización de 12 MIRU-VNTR donde se determinaron 2 perfiles MIRU – VNTR en las cepas de *M. bovis* el perfil: 232 224 263 322 se detectó en solo un aislado, el cual se ha reportado anteriormente presente en Argentina, Australia y EUA, y el 232 224 253 322 se detectó en 3 aislados (García Ortiz 2013).

Patogenia

Para establecer la patología de la TBB, se debe distinguir entre una primera infección, en la que la micobacteria entra en contacto por primera vez con un organismo, o un fenómeno post primario, en el cual ya ha existido un contacto previo y por lo cual el animal presenta inmunidad y se desarrolla la enfermedad (Hermoso de Mendoza 1992). *M. bovis* tiene la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos, esto se da porque se inhibe la fusión del fagosoma con el lisozoma, por lo que el bacilo no es digerido quedando en estado de latencia (Aldwell et al. 2001).

Proceso primario

La entrada de la micobacteria se da prioritariamente por vía aérea, vehiculada por micro partículas o aerosoles. En la zona donde se establece el foco primario de infección se produce una pequeña zona necrótica, que contiene bacilos vivos y muertos, rodeada de una capa de macrófagos. A partir de la localización primaria, la micobacteria pasa por vía hemolinfática a los ganglios linfáticos (GL) regionales donde se desarrollan lesiones, quedando de esta forma constituido el complejo primario de Ranke (Hermoso de Mendoza 1992). Esta lesión primaria, junto con el GL regional, es denominada “el complejo

primario”. En el foco primario los macrófagos y las células epiteliales se aglutinan entre sí para formar a las células gigantes de tipo Langerhan, para contener a los bacilos y que no se distribuya hacia otros órganos. Esto da la formación del granuloma, los linfocitos, células plasmáticas y monocitos forman parte de éste, cuando la lesión progresa hay fibrosis periférica y necrosis caseosa central (Bryson 1994). Al realizar un corte sobre la lesión granulomatosa, se observa un centro necrótico caseoso amarillento, y comúnmente la calcificación en áreas de necrosis. La mayoría de los casos de TBB son adquiridos por inhalación de *M. bovis* por lo que se piensa que el complejo primario se va a encontrar en los pulmones asociado a los GL, sin embargo en algunos casos de neumonía tuberculosa crónica, las lesiones de GL pueden estar ausentes, pero en general la frecuencia de lesiones primarias de pulmón en ganado tuberculoso son usualmente de menor tamaño, en comparación con los nódulos linfáticos torácicos (Bryson 1994). Las lesiones primarias pueden ser únicas o múltiples, pueden involucrar a uno o a los dos lóbulos del pulmón. El proceso tuberculoso primario usualmente comienza en la bifurcación bronquial y alveolar el cual se extiende hacia los alvéolos. El cuadro histológico presenta caseificación central y calcificación alveolar. Las lesiones más tempranas no están encapsuladas sino rodeadas de un tejido alveolar condensado (Bryson 1994).

La TBB pulmonar en bovinos puede difundirse hasta involucrar la pleura. Esto puede tener lugar por expansión directa de una lesión sub pleural debido a una extensión linfогénica o difusión hematогena. La TBB pulmonar es característicamente nodular con lesiones que suelen tener secciones y volverse calcificadas. Además puede llegar a provocar metástasis en órganos como hígado, riñones, ubre y meninges. En el caso del

padecimiento crónico se caracteriza por la formación de granulomas en GL, pulmones, hígado, intestino, bazo, pleura y peritoneo (Bryson 1994).

Proceso post primario

Este sucede en animales ya sensibilizados, que sufren una segunda infección de origen exógeno o endógeno. Siendo esta última la más frecuente en los animales (Bryson 1994). En TBB de tipo congénito, el complejo primario está en los GL, hígado y en el portal linfático, aunque las lesiones primarias no son siempre obvias. La expansión de la enfermedad es rápida y la muerte del becerro es en cuestión de semanas, en cuyo estado la enfermedad está generalizada. Comúnmente, las lesiones son encontradas en el intestino del ganado que ha ingerido una gran cantidad de bacterias (Bryson 1994).

Una característica de la micobacteria es la habilidad de resistir la actividad microbicida del macrófago (Aldwell et al. 2001). Las micobacterias al penetrar el organismo, son fagocitadas por los macrófagos que se localizan en las mucosas respiratorias o digestivas. Los macrófagos fagocitan a la micobacteria para destruirla por medio de distintas enzimas: lipasas, fosfolipasas, proteasas y lisozimas, pero estas no son liberadas pues se inhibe la fusión del fagosoma con el lisozoma. La micobacteria tiene la capacidad de aglutinarse entre ellas, debido a las características de su pared celular ricas en lípidos, a esta forma de congregarse se le llama factor cordón, la acción de este factor producirá la destrucción de las mitocondrias teniendo como consecuencia alteraciones en la espiración y fosforilación oxidativa, con lo que favorecerá a la formación del granuloma (Hermoso de Mendoza 1992). Como consecuencia de una incapacidad de los macrófagos

para la destrucción del bacilo tuberculoso, después de 10 días de la infección, se desarrolla un proceso de inmunidad mediada por células o hipersensibilidad retardada o de tipo IV. Esto se debe a una mezcla de células epiteliales y gigantes formando un granuloma, el cual desarrolla fibroplasia periférica y una necrosis caseosa, que conlleva a una hipersensibilidad de cuarto grado. La reacción inflamatoria produce tejido de granulación con tejido fibroso periférico y la presencia de linfocitos adyacentes a los vasos sanguíneos que conforman un granuloma, la estructura más típica de la TBB (Hermoso de Mendoza 1992; Tizard 2004).

Diagnóstico de TBB

En México para efectos de Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, el diagnóstico de la TB se lleva a cabo por medio de: tuberculización, análisis bacteriológico e histopatológico, y otros que determine la SAGARPA (SAGARPA 1995b).

Prueba de tuberculina

La prueba de la tuberculina es el método estándar para el diagnóstico de la TBB en el ganado, es principalmente una prueba decampo que incluye la demostración de la respuesta inmune a la infección por *M. bovis*. La respuesta inmune mediada por células, es la principal reacción inmunológica observada en la mayoría de las especies, incluyendo al ganado bovino (SAGARPA 1995b).

Las pruebas de tuberculina autorizadas en México por la SAGARPA y las cuales deben ser aplicadas por Médicos Veterinarios aprobados por dicha Secretaría en TBB y/o personal oficial aprobado. Las pruebas de tuberculina autorizadas son dos, la primera llamada Derivado Proteico Purificado (PPD) bovino, elaborada con *M. bovis* cepa AN5, que se utiliza en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple, y la segunda PPD aviar, elaborada con *M. avium* cepa D4, que será utilizada en la prueba cervical comparativa. La tuberculina de PPD aviar debe contener como colorante el rojo de Ponceau, para distinguirla de la de PPD bovino que no lleva colorante (SAGARPA 1995b).

Las tuberculinas deben ser transportadas y conservadas en frío a una temperatura de 4 a 8 °C y protegidas de la luz solar directa durante el trabajo de campo, debe verificarse el lote y fecha de caducidad del producto. Una vez utilizado el antígeno, deberá desecharse el resto del contenido del envase si no se va a utilizar el mismo día. El instrumental necesario para la realización de la tuberculinización se ajustará a las siguientes especificaciones: Se utilizarán jeringas graduadas de 1 ml con graduación de 0.1 ml, de preferencia desechables, automáticas o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado. Las agujas serán hipodérmicas, calibre 24 a 26 de 0.5 a 1.0 cm de largo, de preferencia desechables o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado. Para la prueba cervical comparativa se usará un cutímetro metálico o de plástico como el vernier, graduado en mm (SAGARPA 1995b). Para la aplicación de cualquiera de las pruebas, éstas deben realizarse de forma única, en las 72 horas siguientes no efectuarse otro tipo de manejos, como son el herrado, desparasitado, vacunación y otros, con el fin de no afectar los resultados (SAGARPA 1995b).

Prueba caudal

Rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en pliegue caudal de la cola. Esta prueba se aplica mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD bovino. Previo a la inoculación, se levanta el pliegue caudal de la cola en el centro del área rasurada y se procederá a medir el grosor, utilizando un cutímetro. El registro final de las medidas deberá redondearse según el siguiente criterio: de 6.2 baja a 6.0, 6.3 sube a 6.5; de 6.7 baja a 6.5; de 6.8 sube a 7; debiendo registrarse los valores en los formatos (SAGARPA 1995b).

Prueba cervical comparativa

Rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación superior será cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior será aproximadamente de 13 cm debajo de la anterior. El PPD aviar se inocula intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de esta prueba se realizará 72 horas (+6 horas), midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones, éstas serán anotadas en el formato oficial de la prueba cervical comparativa, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda; una vez realizada esta operación se procede a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial se interpretarán los resultados (SAGARPA 1995b).

Prueba cervical simple

Esta prueba se emplea para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis* o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*. Se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación será aproximadamente 10 cm debajo de la cresta. Esta prueba se aplica mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD bovino en la región media cervical, haciendo la lectura el mismo Médico Veterinario que aplicó la prueba mediante la observación y palpación del sitio en donde se practicó, realizándose a las 72 +6 horas posteriores a su inoculación. Las reacciones se clasifican como negativa: cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación. Reactor: cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación (SAGARPA 1995b). La prueba de tuberculina ha demostrado su gran utilidad para el control de esta enfermedad bajo un esquema de aplicación periódica. Esta estrategia, aunque presenta una buena sensibilidad y especificidad para la identificación de animales infectados, ha sido insuficiente para lograr la erradicación de la enfermedad (Estrada Chávez et al. 2001).

La prueba de tuberculina no se debe repetir antes de 60 días, lo que la hace lenta y dificulta el manejo del ganado para la prueba (Adams 2001). Otro problema de esta prueba reside en que no detecta animales sin hipersensibilidad tardía hacia *M. bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una infección diseminada o con una infección reciente, debido a que en estos casos la inmunidad celular se encuentra deprimida o en proceso de desarrollo (Ritacco et al. 1991).

Diagnóstico histopatológico

Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Las muestras obtenidas son fijadas en formol al 10%, y sometidas a un proceso de deshidratación, aclaración e inclusión para la preparación de los cortes histopatológicos, para ser coloreadas con hematoxilina-eosina y el método de Ziehl-Neelsen (Z-N) modificado para tejidos. De la observación microscópica de los cortes se consideran lesiones compatibles con TB cuando se observan los componentes celulares descritos en el ítem lesiones. Con la coloración de Z-N se pueden observar bacilos ácido-alcohol resistente en el citoplasma de las células epitelioides, células gigantes y en la zona de necrosis.

Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico es un método sensible y específico para detectar la presencia de micobacterias en una muestra determinada. Los medios de cultivo primario 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 semisintético como el Middlebrook 7H10 y 7H11, los medios sólidos a base de huevo coagulado, como Löwenstein-Jensen y Stonebrink y los medios de caldo como el Middlebrook 7H9 y 7H12 (Jawetz 2013).

Para procesar muestras para el cultivo, en primer lugar se homogeneiza el tejido mediante un mortero, un digestor o una mezcladora, y a continuación se descontamina con

detergente como cloruro de hexadecilpiridinio [HPC] 0.75–0.5 %, un álcali, como hidróxido de sodio al 2–4 % o ácido oxálico al 5 %. La mezcla de álcali o ácido se agita durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se neutraliza. La neutralización no es necesaria cuando se utiliza HPC. La suspensión se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el sedimento se utiliza para el cultivo y el examen microscópico. Se recomienda que, como mínimo, se realice un cultivo de muestras compuestas de ganglios linfáticos de la cabeza y el tórax cuando no se detecten lesiones visibles en los animales positivos a la prueba de la tuberculina o del interferón en el examen post-mortem (OIE 2012).

Para el aislamiento primario, el sedimento se inocular en un medio de cultivo generalmente medios sólidos basados en huevo, como el Stonebrink. Los cultivos se incuban durante un mínimo de 8 semanas y preferiblemente durante 10-12 semanas a 37°C con o sin CO₂. Los medios deben estar en tubos bien cerrados para evitar la desecación. Se comprueba si en las superficies inclinadas hay crecimiento macroscópico a intervalos periódicos durante el periodo de incubación. El crecimiento de *M. bovis* en general tiene lugar en un plazo de 3-6 semanas de incubación en función de los medios utilizados (OIE 2012).

Se utilizan sistemáticamente sistemas de cultivo líquido en algunos laboratorios de hospitales y veterinarios; en estos sistemas el crecimiento se mide por métodos radiométricos o fluorométricos. Si se produce una contaminación macroscópica de los medios de cultivo, el proceso de cultivo deberá repetirse utilizando los inóculos retenidos con un descontaminante distinto. El factor limitante en el aislamiento suele ser la mala

calidad de las muestras enviadas y deben realizarse todos los esfuerzos posibles para asegurarse de que el laboratorio recibe las muestras de calidad (OIE 2012).

INF –Gamma Interferón

En el año 1985 fue desarrollado este ensayo el cual se basa en que solamente el bovino infectado con *M.bovis* tendrá linfocitos T circulantes que reaccionarán ante la PPD bovino, secretando interferón. Esta secreción se realiza en cantidades capaces de ser leídas y mensuradas a través de inmunoensayo. Esta prueba involucra la incubación de alícuotas de sangre heparinizada con PPD bovino, PPD aviar (antígeno reactivo cruzado) y buffer fosfato salino como control negativo (PBS, pH 7.3), durante 24 hs a 37° C y 5% de CO₂, recuperando posteriormente el plasma. Interferón gamma fue incorporada al programa de control y erradicación de algunos países (por ejemplo: Nueva Zelanda), con resultados exitosos (Rothel et al. 1990; Wood et al. 1990).

Diagnóstico de TBB en humanos

Para distinguir *M. bovis* de otros miembros del CMT, se realiza la identificación de los aislados determinando propiedades bioquímicas y de cultivo. En un medio sólido adecuado con piruvato, las colonias de *M. bovis* son lisas y de color pardusco. *M. bovis* es sensible a la hidrazida del tiofen-2-ácido carboxílico y a la hidrazida del ácido isonicotínico (OIE 2012). Las cepas de *M. bovis* son también sensibles al ácido para-amino salicílico y a la estreptomina. Las concentraciones efectivas de estos compuestos son diferentes en medios con huevo y en medios con agar. La producción de niacina, la reducción de nitrato así como la nicotaminidasa y pirazinaminidasa dan resultados negativos en *M. bovis*, sin embargo en la prueba de la amidasa, es positivo para ureasa (OIE 2012). Para diferenciar *M. bovis* de otros miembros del CMT, las técnicas de identificación molecular basadas en la amplificación por PCR de alguna región del genoma previamente conocida como polimórfica entre los miembros del CMT, representan un método rápido y de mayor precisión que los métodos bioquímicos (Zumárraga 1999; Bakshi et al. 2005).

En México, no existen reportes oficiales sobre la proporción de casos de *M. bovis* en humanos, debido a que ninguna institución de salud dictaminada la identificación de la especie infectante en pacientes con diagnóstico de TB.

Características genéticas de *M. bovis* AF2122/97

La cepa de *M.bovis* AF2122/97 aislada en 1997 en Gran Bretaña, es descrita como virulenta ya que fue aislada de un vacuno con lesiones granulomatosas en ganglios linfáticos pulmonares y broncomediastínicos (Garnier et al. 2003). El tamaño del genoma es de 4,345,492 pb, con un contenido de G+C de 65.63% y 4,003 genes que codifican para 3,952 proteínas, mostrando colinealidad y ninguna evidencia de translocaciones extensas, duplicaciones o inversiones (Figura 2)(Garnier et al. 2003). A través de la genómica comparativa del complejo de *M. tuberculosis*, mediante el uso de métodos basados en hibridación (Behr et al. 1999; Gordon 1999), se identificaron 11 deleciones del genoma de *M. bovis*, que varían en tamaño desde 1 a 12.7 kb, y estos han sido confirmados derivados de la secuencia genómica (Garnier et al. 2003).

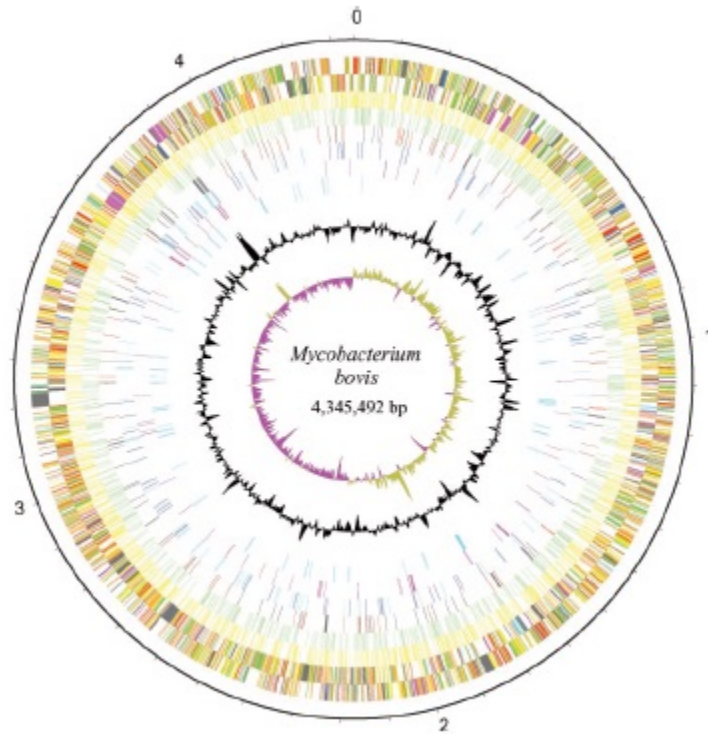


Figura 2. Representación circular del genoma de *M. bovis*. La escala se muestra en mega bases por el círculo negro exterior. Moviéndose desde afuera, los dos siguientes círculos muestran CDS de cadena directa e inversa, respectivamente, con colores que representan la clasificación funcional. Se muestran las comparaciones con la secuencia de *M. tuberculosis H37Rv*, con transiciones (amarillo) y transversiones (verde), luego inserciones (rojo, 1 pb; negro 1 pb) y deleciones (azul oscuro, 1 pb, los reemplazos de secuencia por regiones novedosas en *M. bovis* se muestran entonces (púrpura). Los elementos ES y fago (cyan) se muestran en el siguiente círculo, con contenido de GC y finalmente GC (G-C) / (G C) mostrados usando una ventana de 20 kb (Garnier et al. 2003).

Comparación de las características genéticas entre *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*

Los genomas de *M. tuberculosis H37Rv* y de *M. bovis AF2122/97* son 99.95% idénticos a nivel de nucleótidos, sin embargo las diferencias están en los genes reguladores que afectan a la expresión de una amplia gama de genes (Garnier et al. 2003). En la era postgenómica, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) han surgido como una herramienta para delinear las relaciones filogenéticas entre cepas estrechamente relacionadas de bacterias patógenas, incluyendo *M. tuberculosis*. Existen 2,437 SNPs entre *M. bovis AF2122/97* y *M. tuberculosis H37Rv* (Fleischmann et al. 2002). Los SNP han demostrado ser responsables de características distintivas entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Por ejemplo, una mutación puntual (SNP) en el gen que codifica a la enzima pirazinamidasa (*pncA*) en *M. bovis* le confiere resistencia a la pirazinamida (Scorpio & Zhang 1996; Scorpio et al. 1997; Boshoff et al. 2002).

Aproximadamente el 10% de la capacidad codificante del genoma de *Mycobacterium* codifica genes de la familia PE y PPE, las cuales tienen importancia en su patogenicidad (Cole et al. 1998). La familia PE la constituyen 100 genes aproximadamente y la familia PPE tiene alrededor de 70 genes. Se caracterizan por la presencia de motivos Prolina-Glutamina y Prolina-Prolina-Glutamina cercanos al extremo amino terminal de sus proteínas (Cole et al. 1998). Existe una gran variación en genes que codifican para las familias de proteínas PE-PGRS y PPE (Cole et al. 1998).

Entre *M. bovis* AF2122/97 y *M. tuberculosis* H37Rv se observa gran variación en genes que codifican para 29 proteínas PE_PGRS y 28 PPE. Estas variaciones se deben a inserciones y deleciones en el marco de lectura mientras que en otras existe un desfase en el marco de lectura (Garnier et al. 2003). Aproximadamente el 60% de estas proteínas son diferentes entre las cepas del complejo CMT, a diferencia de lo que ocurre con el resto del genoma en donde la mayoría de los genes entre las especies son idénticos. Esto indica que los genes de las familias PE-PPE son secuencias polimórficas, y origen de variación antigénica entre distintas cepas (Garnier et al. 2003).

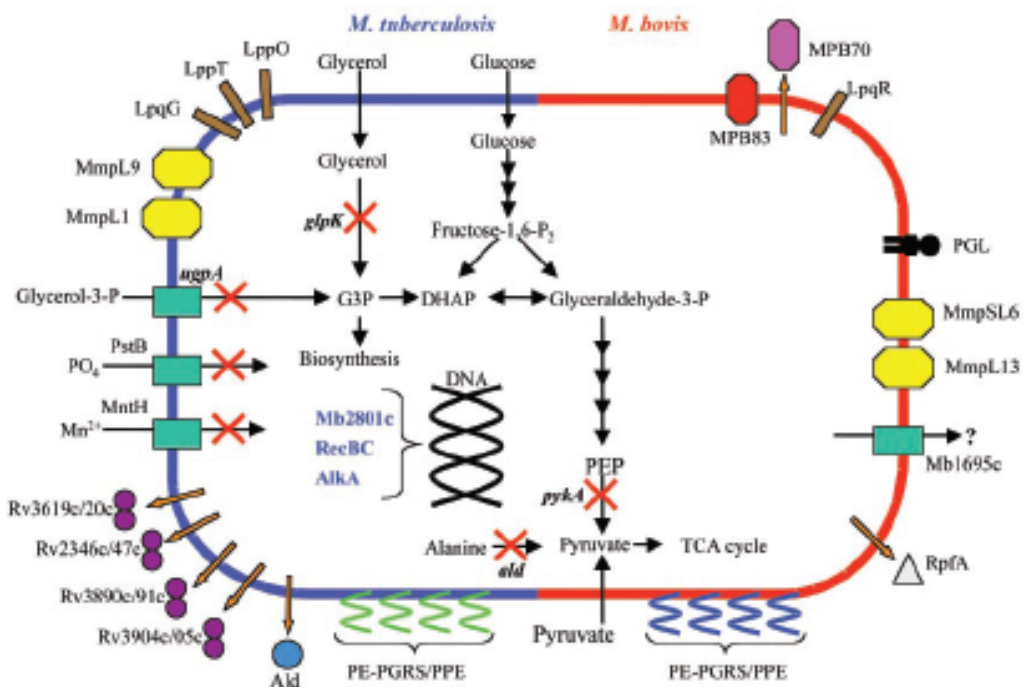


Figura 3. Esquema de las principales diferencias en la pared celular y variaciones antigénicas entre *M. bovis* AF2122/97 y *M. tuberculosis* H37Rv. Las líneas azules y rojas representan la pared celular; con el azul mostrando a *M. tuberculosis* y rojo mostrando *M. bovis*. Las moléculas expuestas a la superficie y de transporte particulares a cada bacilo se muestran incrustadas en la pared. Debido a que el gran número de diferencias en el PE-PGRS y PPE están más allá del alcance de este diagrama, son meramente representados por moléculas expuestas a la superficie. Las proteínas diferenciadamente segregadas (flechas naranjas) se muestran en cada mitad. El interior del diagrama muestra los pasos clave en el metabolismo de los carbohidratos, con las cruces rojas mostrando donde las lesiones ocurren en *M. bovis*. Las proteínas que interactúan con el ADN que se inactivan en *M. bovis* se muestran en azul. PGL, glicolípido fenólico; G3P, 3 - fosfato de glicerol; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; PEP, fosfoenolpiruvato; Ald, alanina deshidrogenasa (Garnier et al. 2003).

Identificación molecular de la especie

Para la identificación de *M. bovis* se puede realizar con ADN de tejido o muestras biológicas, sin cultivo previo, en donde se amplifica un segmento de ADN de un gen de la micobacteria para de esta forma identificar la especie infectante (Wards et al. 1995; Cousins 2001). Para la identificación y diferenciación rápida entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* ha sido utilizado exitosamente como marcador molecular el operón *mce-3*, ya que en esta región *M. bovis* carece de un fragmento de 12.7 kb, el cual está presente en *M. tuberculosis*. Este bloque de delección, involucra a la mayor parte del operón mencionado lo cual puede estar relacionado con la virulencia en estas dos especies (Zumárraga 1999; Bakshi et al. 2005).

Caracterización molecular del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El desarrollo de metodologías de caracterización molecular ha revolucionado el estudio de la TB. Estas técnicas, mediante el estudio de distintas regiones genómicas de las micobacterias, son capaces de desvelar el genotipo de la cepa, es decir, de generar un patrón genético específico de cada una de ellas. Esto ha permitido realizar estudios de transmisión global de la enfermedad, que permiten una comparación de cepas circulantes en distintas poblaciones y de esta manera establecer si hay un flujo genético de una población a otra, también han permitido la revelación de las bases genéticas implicadas en el desarrollo de resistencia a medicamentos, caracterizar brotes, hacer distinción entre transmisiones recientes o antiguas, detectar si hay contaminación cruzada en el laboratorio, detección de reinfección o recaída en pacientes con episodios secundarios de TB, identificación de poblaciones con alto riesgo de transmisión para la posterior

implementación de la estrategia de control adecuada para contrarrestar la transmisión. Un método de genotipificación molecular debe ser preferiblemente rápido, sencillo de realizar de bajo costo, fácilmente aplicable en muestras clínicas o que no requiera una gran cantidad de bacterias en cultivo, con un buen poder discriminatorio entre cepas, y que los marcadores genéticos sean estables (Supply et al. 2000; Hawkey 2003; Kwara 2003; Supply et al. 2006; Rodwell et al. 2010). A continuación se detallarán las herramientas de genotipado más utilizadas así como sus aplicaciones en diferentes contextos.

RFLP-IS6110

Los primeros estudios para identificar los genotipos en *M. tuberculosis* se realizaron mediante la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del elemento de inserción IS6110 (RFLP-IS6110). Este elemento se caracteriza por estar presente en múltiples copias y en distintas regiones del genoma del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (Figura 4, Cave et al. 1991). Sin embargo, se requiere grandes cantidades de ADN, es difícil de comparar entre laboratorios y tiene la desventaja de tener un bajo poder de discriminación entre cepas con bajas copias de IS6110 (Kremer et al. 1999; Cowan & Crawford 2002; Lee et al. 2002a).

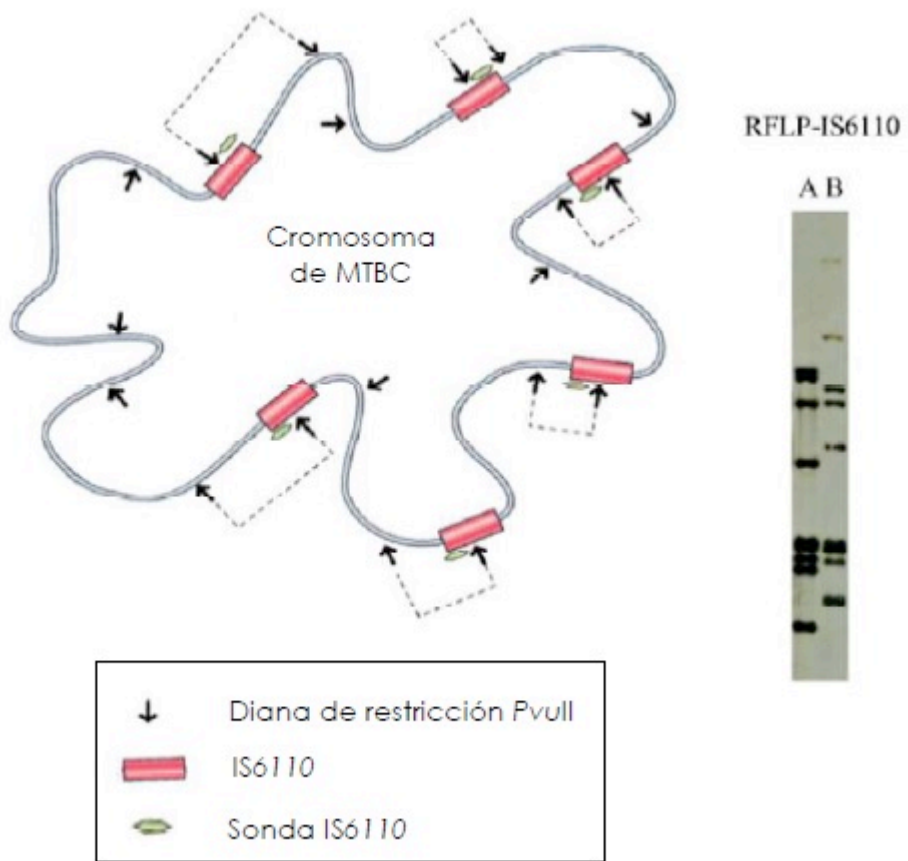


Figura 4. Representación del cromosoma del CMT con las IS6110, dianas de restricción *PvuII* y las sondas IS6110 y ejemplos de 2 patrones de cepas A y B

Espoligotipado

En la actualidad es una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Este método se basa en la presencia o ausencia de variantes de DR (DVR, por sus siglas en inglés). Las DVR se componen de una secuencia repetida de 36 pb conservada y de una secuencia espaciadora variable de 35 a 41 pb: el blanco de la tipificación es esta región variable. El cromosoma de la cepa *M. tuberculosis H37Rv* tiene 48 DVR y el de *M. bovis* BCG 41 (Figura 5). De este modo, para la genotipificación se utilizan de manera rutinaria 43 espaciadores, 37 de *H37Rv* y 6 de BCG. (Caimi et al. 2001; Cobos-Marín et al. 2005; Javed et al. 2007). La presencia o ausencia de espaciadores, permite crear bases de datos sencillas, con un código binario de 1 (presencia) y 0 (ausencia), las cuales sirven para formar matrices que más tarde son utilizadas en diferentes tipos de análisis filogenéticos para determinar grupos de cepas de similitud genética. Tiene la ventaja de ser un método de bajo costo pueden correlacionarse con otros marcadores genéticos, es altamente reproducible y tiene un buen nivel de sensibilidad para diferenciar entre cepas.

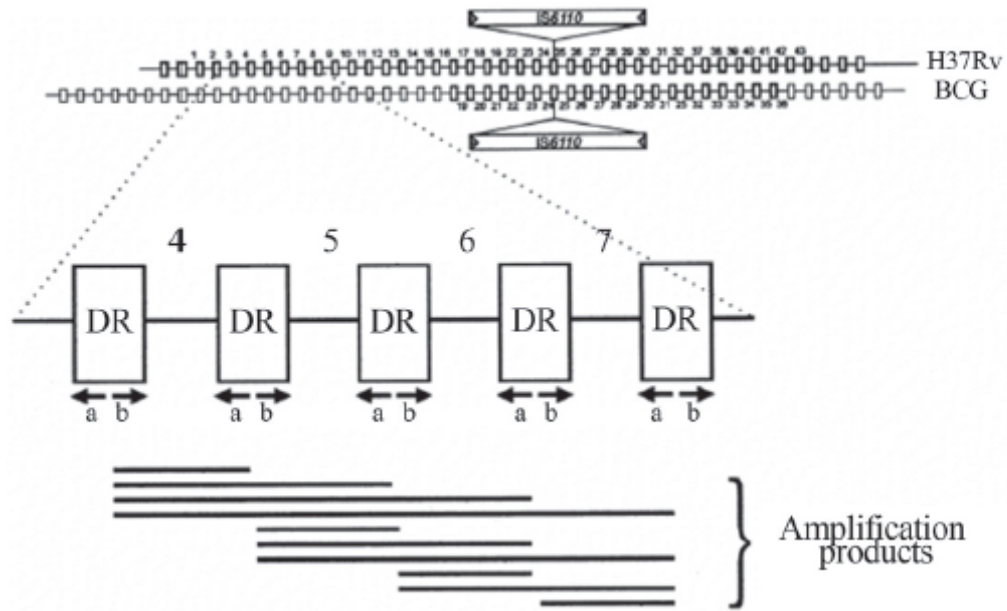


Figura 5: Estructura del locus DR en el genoma micobacteriano. (A) Múltiples DRs en los cromosomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (representados como rectángulos) se intercalan con espaciadores únicos que varían en longitud de 35 a 41 pb. Los espaciadores (numerados) utilizados corresponden a 37 espaciadores de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 a *M. bovis* BCG. Se representa el sitio de integración del elemento de inserción IS6110. (B) Principio de amplificación in vitro de la región DR mediante PCR. Cualquier DR en la región DR puede servir como un diana para estos cebadores; Por lo tanto, el ADN amplificado está compuesto por una mezcla de un gran número de fragmentos de diferentes tamaños (Kamerbeek 1997).

1.1.3 MIRU-VNTR

Los marcadores MIRU-VNTR (Figura 6) “número variable de unidades interespaciadas de repetición en tándem micobacterianas” representa una estrategia de genotipado 100% reproducible, sensible y específica, con un alto poder de discriminación entre las cepas del CMT (Supply et al. 2000; Mazars et al. 2001; Supply et al. 2001; Cowan & Crawford 2002; Oelemann et al. 2007; Allix-Béguet et al. 2008). Se encuentran dispersos en 41 regiones del cromosoma de *M. tuberculosis H37Rv*, de los cuales 12, 15 y 24 son altamente polimórficos (Supply et al. 2006). Se caracterizan por tener un tamaño 51 a 77 pb de longitud, son polimórficos en el número de repeticiones en tándem y a nivel de secuencia entre las unidades de repetición. Esta técnica se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante cebadores específicos para las regiones que flanquean a los VNTRs, y la determinación de los tamaños de los productos amplificados por medio de electroforesis. Al conocer la longitud de las unidades de repetición, sus tamaños reflejan el número de repeticiones de los VNTR amplificados. El producto final es una clave numérica que corresponde al número de repeticiones de cada locus de VNTR. Estos genotipos numéricos son convenientes para estudios comparativos intra e inter-laboratorios.

La técnica de MIRU-VNTR tiene la gran ventaja de ser un procedimiento automatizado el cual cuenta con bases de datos de acceso público que permiten el análisis y la comparación de resultados en forma rápida y precisa (Mazars et al. 2001; Supply et al. 2001; Allix et al. 2004). Diversas investigaciones han utilizado los MIRU-VNTR para estudios genéticos y epidemiológicos, así como para analizar cambios evolutivos en las

población-es de patógenos y para darle seguimiento a los brotes infecciosos de *M. tuberculosis* (Allix et al. 2004). Asimismo, se han empleado para detectar infecciones de TB por múltiples cepas, para identificar contaminación cruzada en laboratorios, determinar el origen y dispersión de las cepas (Allix et al. 2004; Dickman et al. 2010).

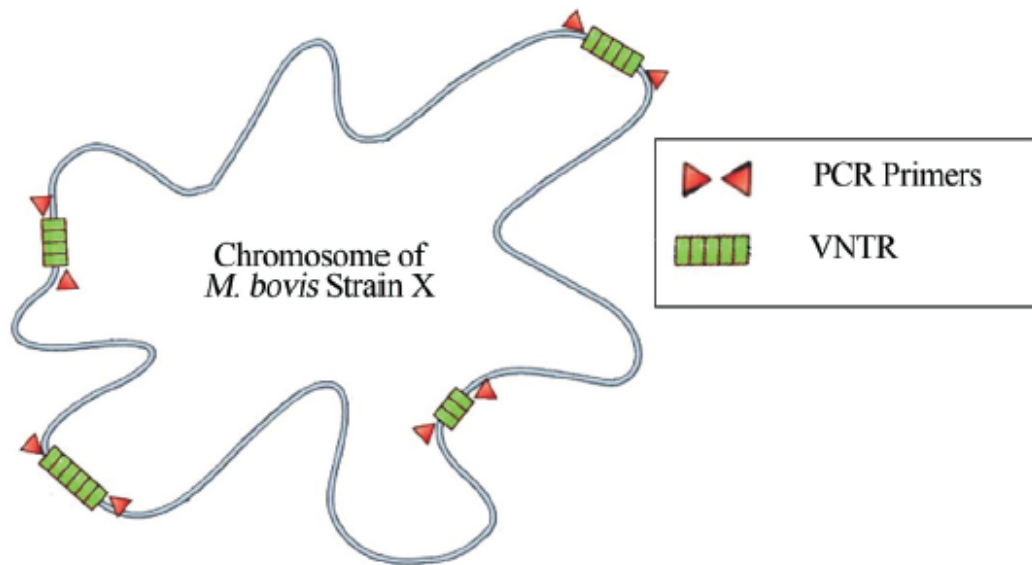


Figura 6. Esquema del cromosoma *M. bovis* con loci VNTR (verde), una variación en el número de segmentos cortos y repetidos contenidos en un locus específico. La amplificación de un cebador de PCR específico (rojo) que flanquea el locus produce fragmentos de ADN cuyas longitudes varían dentro de las cepas. El número de repeticiones por locus varía entre las cepas.

Secuenciación de genoma completo

El rápido desarrollo de la tecnología para secuenciar ácidos nucleicos ha permitido reducir costos y tiempos de ejecución (Ford et al. 2012). La secuenciación del genoma completo (SGC) del CMT se ha utilizado para investigar una amplia gama de temas sobre la biología celular y molecular de estos microorganismos. Ahora se tiene la capacidad, sin precedente, de utilizar la SGC, o secuenciación masiva; y así analizar en forma global el genoma del CMT, y por tanto empezar a comprender la relación, la diversidad genética de patogenicidad y resistencia a fármacos de las especies del CMT. La SGC tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido o mutaciones puntuales, inserciones y variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) (Armengol 2012).

Secuenciación de Genoma Completo mediante pirosecuenciación

En esta técnica, primero se procede a fragmentar el ADN y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos. Los fragmentos de ADN posteriormente se amplifican clonalmente y se agrupan (*clustering*) para ser utilizados como entidades a secuenciar. Las secuencias cortas producidas por el instrumento a partir de los extremos del ADN con los adaptadores se denominan lecturas o *reads*. Las lecturas de tipo *paired end* se generan mediante la fragmentación del ADN en pequeños segmentos (< 300 pb) de los cuales se secuencia el final de ambos extremos (Fullwood et al. 2009). Un aspecto importante en la SGC es el número de veces que cada base del genoma está presente en los

reads de secuenciación producidos. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*depth of coverage*, o simplemente, *coverage*) y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma (Fullwood et al. 2009). En experimentos de cuantificación de número de copias de variantes estructurales como deleciones y duplicaciones. Recientemente han aparecido versiones de equipos de SGC con características más limitadas en cuanto a su rendimiento y capacidad de secuenciación pero con mayor facilidad de manejo y enfocados a un segmento de mercado distinto. Algunos ejemplos son los equipos 454 GS Junior de Roche, MiSeq Personal Sequencer de Illumina e Ion Torrent de Life Technologies (Metzker 2010). La SGC produce una gran cantidad de datos que una computadora común no puede manejar (Stein 2010). Aunque para algunas plataformas existen herramientas de manejo de datos y análisis en un único programa, cualquier tarea no trivial a realizar con los datos requerirá al menos de una persona con conocimientos en bioinformática (Richter & Sexton 2009). Por lo que una parte indispensable en la SGC es el análisis computacional para manejar y analizar datos biológicos (Horner 2010). A continuación se describe el valor clínico de la SGC en el CMT

Seguimiento de la transmisión y definición de brotes por SNPs

Las técnicas tradicionales de tipificación de cepas, identifican genotipos de cepas del CMT y definen brotes. Sin embargo, estas técnicas pueden ser inexactas al rastrear las vías de transmisión o determinar si los aislados con diferencias menores pertenecen a un brote (Jagielski et al. 2014; Lee et al. 2015). La SGC puede identificar las diferencias de SNP en las cepas que se clasificaron como idénticas por otras técnicas, y puede rastrear la

transmisión delineando el orden de los cambios de nucleótidos (Luo et al. 2014; Mehaffy et al. 2014). Un ejemplo claro de esto es el estudio de Schürch y colaboradores quienes investigaron un gran brote holandés de 104 cepas de *M. tuberculosis* con patrones *IS6110* idénticos, lo que hace imposible determinar el caso primario y las vías de transmisión. La SGC de tres aislados identificó ocho SNPs específicos para las cepas del brote, el hallazgo de estos SNPs en los 104 aislados, fueron capaces de rastrear la evolución de los cambios de nucleótidos y dividir el brote en cinco grupos de SNPs, cada uno con un caso índice y una cadena de transmisión (Schürch et al. 2010). En otra investigación de un brote de *M. tuberculosis* en 41 casos en Vancouver, Canadá, se realizó la SGC de todos los aislamientos. Mediante la técnica de MIRU-VNTR se observó un solo perfil de genotipo, sin embargo, mediante SGC se detectaron dos brotes concomitantes causados por dos cepas con genotipos MIRU-VNTR idénticos que habían evolucionado a partir de un antepasado común (Gardy et al. 2011).

La tasa de mutación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

La tasa de mutación de las bacterias del CMT es importante para definir los grupos de brotes, las líneas de transmisión y la evolución bacteriana. En los estudios de transmisión (Gardy et al. 2011; Colangeli et al. 2014), hay acuerdo entre las estimaciones de 0.3 - 0.5 SNPs por año por genoma, que son consistentes con la estimación de SNPs 0.2 por genoma por año basado en el ADN de aislamientos antiguos (Bos et al. 2014). Se informó la misma tasa de mutación de 0.3 – 0.5 mutaciones al año en cepas cultivadas in vitro e inesperadamente en cepas a partir de un modelo de primates con tuberculosis activa,

latente o de reactivación. Este hallazgo implica que las mutaciones del ADN continúan produciéndose en la misma proporción en una infección pulmonar latente (Ford et al. 2011). Sin embargo, Colangeli et al. 2014 calcularon la tasa de mutación en la tuberculosis humana latente mediante la SGC y obtuvieron un resultado diferente. Ellos examinaron cuatro cepas adquiridas a partir de un caso índice común; dos pacientes desarrollaron tuberculosis dentro de los 2 años de exposición y dos desarrollaron tuberculosis más de 20 años después. Las tasas de mutación en las cepas humanas latentes fueron al menos diez veces más bajas que en las cepas de los casos que desarrollaron tuberculosis poco después de infectarse y las tasas de replicación bacteriana fueron mucho más lentas en la enfermedad latente.

La filogenia y evolución del CMT

Todas las especies dentro del CMT evolucionaron de una cepa ancestral común a través de una serie de deleciones cromosómicas (Brosch 2002). Se cree que el pariente más cercano de la cepa ancestral original es *M. canettii*, una cepa de colonia lisa aislada sólo en Djibouti, África del Este. Se han identificado menos de 100 cepas de *M. canetti*, ya que fueron descritas por primera vez por van Soolingen y sus colegas en 1997 (Pfyffer et al. 1998). Cinco genomas de *M. canettii* secuenciados fueron 10-115 kb más grande que otros miembros del CMT (Supply et al. 2013), además mostraron una mayor diversidad genómica y más SNPs que en todas las otras cepas del CMT combinado. A diferencia de *M. tuberculosis*, *M. canettii* ha adquirido material genético a través de eventos de recombinación homóloga. Las cepas de *M. canettii* crecen más rápido que las cepas de *M.*

tuberculosis, formando colonias en aproximadamente 9 días, y aunque pueden causar enfermedades humanas graves, son menos virulentas en ratones (Supply et al. 2013).

Los agrupamientos filogeográficos de cepas de *M. tuberculosis* basados en el análisis de pequeñas regiones del cromosoma han sido imprecisos (Supply et al. 2006; Zhang & Yew 2015), pero el análisis de las diferencias y supresiones de SNPs en los genomas de cientos de cepas geográficamente diversas produjo árboles filogenéticos detallados que dividen las cepas de *M. tuberculosis* en linajes principales (Comas et al. 2013). El linaje 1 (Indo-Oceánico), que es más común en Filipinas y el borde del Océano Índico (también reportado en Djibouti), junto con los linajes *M. africanum* 5 y 6 y el linaje 8, que consiste en todas las cepas animales, se denominan colectivamente linajes ancestrales. De los linajes modernos, el linaje 2 (Asia oriental) predomina en Asia oriental, pero también se informa en Asia central y Rusia, e incluye a la familia de Beijing. El linaje 3 está centrado en la India y el este de África, mientras que el linaje 4 (Euro-Americano) las cepas se localizan en Europa, las Américas, África, y Oriente Medio.

Resistencia a fármacos

Las especies dentro del CMT son naturalmente resistentes a muchos antibióticos. Esta circunstancia dificulta mucho el tratamiento contra la TB. En el CMT la resistencia a los antibióticos es, en gran medida, debida a la pared celular de los bacilos; la cual es muy hidrofóbica y actúa como una barrera de permeabilidad (Gagneux et al. 2006b). Por otro

lado, mucho del potencial de resistencia de MTB está codificado en su genoma (Gagneux et al. 2006a). Éste incluye genes que codifican para enzimas hidrolíticas y para enzimas modificadoras de fármacos, como las beta-lactamasas y las aminoglicósido-acetiltransferasas. Además de diversas proteínas transportadoras de eflujo (*efflux*), tales como 14 miembros de la súper familia mayor facilitadora (*Major Facilitator Superfamily*), y numerosos transportadores tipo ABC (*Adenosine Triphosphate Binding Cassetes*). Por otro lado, se conocen diversas mutaciones que confieren resistencia al CMT contra los medicamentos de primera y segunda líneas, utilizados para el tratamiento de las especies dentro del CMTE. Estas bacterias están distribuidas en todo el mundo. Generalmente, el surgimiento de cepas del CMTE. resistentes a fármacos antituberculosos durante el tratamiento, conocido como la resistencia adquirida, se asocia con un inadecuado uso del régimen de antibióticos o un tratamiento incompleto (Chiang et al. 2010) con resultados clínicos desfavorables (Seung et al. 2004).

La aparición y desarrollo de las técnicas moleculares está permitiendo un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, de los factores de virulencia y de los mecanismos de resistencia lo que dará lugar en un futuro inmediato a nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad (Zumárraga et al. 2013).

Las mutaciones conocidas que confieren resistencia no pueden explicar por qué las cepas con mutaciones idénticas tienen diferentes niveles de resistencia, por qué algunas cepas resistentes a un antibiótico no tienen mutaciones conocidas asociadas con esa

resistencia, o por qué algunas cepas resistentes no se transmiten, pero otras cepas altamente resistentes causan grandes brotes (Lanzas et al. 2013).

El uso de SGC para identificar mutaciones en una sola cepa antes y después del desarrollo de la resistencia es simple (Eldholm et al. 2015), pero el análisis de distintas cepas con cientos de diferencias SNPs (Coscolla & Gagneux 2014; Wozniak et al. 2014) es desafiante. Además, existen diferentes enfoques que hay que abordar para la identificación de nuevas mutaciones de resistencia como lo son: las interacciones epistáticas (interacciones entre las mutaciones de resistencia y otros determinantes genómicos que modulan el fenotipo de la mutación (Trauner et al. 2014), los genes conocidos por ser asociados con la resistencia a los fármacos y sus regiones circundantes.

Mutaciones compensatorias

La resistencia a fármacos en las bacterias se asocia frecuentemente con un costo de la aptitud, lo que se traduce a una tasa de crecimiento disminuida en comparación con la cepa de campo (Andersson & Hughes 2010b). Sin embargo este costo no es universal, existen aislados microbiológicos de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos los cuales han demostrado tener niveles de aptitud similares a los de la cepa de campo (Gagneux 2009). Los efectos heterogéneos de la resistencia a fármacos, dada por mutaciones pueden atribuirse a varios factores, incluyendo las diferencias preexistentes en el fondo genético de la cepa. Las mutaciones compensatorias pueden compensar de manera parcial o total el costo de la aptitud, dando como resultado una cepa fármacorresistente con una tasa de

crecimiento comparable a la cepa de campo en ausencia de antibióticos (Andersson & Hughes 2010a) *M. tuberculosis* puede adquirir resistencia a la rifampicina a través de mutaciones en el gen, *rpoB* (Ramaswamy et al. 2003). En una serie de estudios se ha demostrado que la adquisición de resistencia a la rifampicina está asociada con un costo de acondicionamiento físico. Sin embargo, en algunos casos, aislados con la mutación S531L *rpoB* no presentaban costo en la aptitud. Por lo que, se sugirió que la mutación S531L *rpoB* no incurrió en estos antecedentes genéticos específicos de la cepa o que se adquirieron mutaciones secundarias que mitigaron la baja inicial del costo de aptitud de la mutación S531L *rpoB* (Gagneux et al. 2006c). En apoyo de lo último, un conjunto de mutaciones compensatorias en los genes de la RNA polimerasa subunidades RpoA y RpoC se describen en aislados de *M. tuberculosis*, Resistentes a RIF (Comas et al. 2012). Estas mutaciones Se asociaron con un aumento de la aptitud física in vitro y se sobre-representaron entre las cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR). Un estudio posterior reporta que 14 de 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con una mutación *rpoB* también llevaba mutaciones no sinónimas en los genes *rpoA* o *rpoC* (Casali et al. 2012), estas mutaciones compensatorias fueron identificados predominantemente en la interacción RpoA-RpoC del gen *rpoC* (codones 356 a 756) (Comas et al. 2012). Las secuencias génicas de las subunidades de la ARN polimerasa son generalmente muy conservadas en *M. tuberculosis* (Casali et al. 2012). Por lo tanto, las mutaciones no sinónimas en estos genes representan adquisición reciente de mutaciones adaptativas en lugar de polimorfismos naturales.

Capítulo I

Diagnóstico *postmortem*, en lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastros de Baja California

RESUMEN

En este estudio se describe la identificación molecular de *M. bovis* y *M. tuberculosis* de lesiones granulomatosas sugestivas a TBB en ganglios linfáticos y pulmón de ganado bovino en Baja California. Las muestras fueron obtenidas de dos ubicaciones, el rastro municipal de Ensenada, B.C. y de un rastro tipo inspección federal en Mexicali B. C. Se obtuvo un total de 319 muestras las cuales fueron sujetas a análisis histopatológicos mediante las tinciones Hematoxilina-Eosina y bacilo-ácido-alcohol resistente mediante Ziehl-Neelsen. Las muestras con resultados positivos en las tinciones histopatológicas se cultivaron en dos medios de cultivo, Löwenstein- Jensen y Stonebrink. Subsecuentemente a la obtención de los aislados microbiológicos se procedió a identificar la especie de micobacteria mediante de amplificación la región *mce-3* por PCR. Se logró identificar a dos especies de micobacterias *M. bovis* y *M. tuberculosis* en 62% y el 38% de los aislados respectivamente. La circulación de ambas especies *M. bovis* y *M. tuberculosis* en el ganado bovino, representa un gran reto para el control de la TBB en México. Deben ser reforzadas las medidas de control para prevenir la infección bacteriana, es necesario monitorear las cepas que circulan a través de la vigilancia molecular en el ganado.

Palabras claves: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, ganado bovino, Baja California, epidemiología, identificación

Introducción

La especie *M. bovis* es responsable de graves daños y pérdidas en la industria ganadera, vida silvestre y salud pública. Históricamente, la carga de TBB en humanos ha estado estrechamente relacionada con la de la TBB en la misma región (Grange 2001), se ha estimado que la proporción de casos de TBB en humanos es de 0.5% - 7.2% (de la Rúa-Domenech 2006), por lo que la erradicación es importancia significativa para reducir el riesgo para la salud pública, proteger la vida silvestre y proteger a la industria ganadera (Gutiérrez Reyes et al. 2012).

La TB en humanos y la TBB producida por *M. tuberculosis* o por *M. bovis* son indistinguibles tanto clínicamente, histopatológicamente y radiográficamente, ya que estos organismos están estrechamente relacionados, sin embargo es de gran importancia la diferenciación entre estas especies, para fines como epidemiológicos, terapéuticos especialmente en países donde la TB es endémica y en donde se presente la transmisión de *M. bovis* entre animales o sus productos y humanos como lo es en México (Grange 2001; Ortiz Muñoz 2015).

Tradicionalmente, la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* se ha basado en diferencias claras en las características fenotípicas y propiedades bioquímicas en comparación con los otros miembros del CMT (Ayele et al. 2004). *M. bovis* muestra una forma de colonia disgónica en el medio de Löwenstein-Jensen, es negativo para la acumulación de niacina y reducción de nitrato, es susceptible a tiofeno-2-carboxílico ácido hidrácido (TCH) y muestra crecimiento microaerofílico en el medio Lebek (Niemann

2000a; Ayele et al. 2004). En contraste, *M. tuberculosis* muestra un crecimiento eugónico, es positivo para la acumulación de niacina y la reducción de nitrato, es resistente a TCH, muestra un crecimiento aerófilo en el medio Lebek y generalmente no es monorresistente a pirazinamida (Niemann 2000a). Otro criterio utilizado para la diferenciación es la resistencia intrínseca a la pirazinamida, que se encuentra en los aislados de *M. bovis* (Niemann 2000a; Ayele et al. 2004).

Más recientemente, se han desarrollado varios métodos moleculares que proporcionan criterios claros para la identificación de *M. bovis*. Estos comprenden una variedad de métodos los cuales se basan en la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, basados en las variaciones de la secuencia de ADN en la región de repetición directa (spoligotyping) de las cepas del complejo CMT (Kamerbeek et al. 1997), en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), o el gen *gyrB* (Niemann 2000b). Además, los aislados de CMT pueden ser diferenciados por polimorfismos de secuencia grande o regiones de diferencia (RD), y según su distribución en el genoma, se ha sugerido un nuevo escenario filogenético para las diferentes especies del CMT (Brosch 2002; Mostowy et al. 2002; Huard 2003).

Sólo unos pocos laboratorios pueden identificar el CMT a nivel de especie (de Kantor et al. 2010). En México, 33 laboratorios son capaces de realizar cultivos para micobacterias, el laboratorio nacional de referencia y 32 laboratorios de salud pública, sin embargo, la identificación a nivel de especie no se realiza rutinariamente y la fuente de infección permanece desconocida.

Objetivo general

Realizar el diagnóstico *postmortem* en ganado bovino con lesiones sugestiva a tuberculosis, sacrificado en rastros de Baja California durante el periodo de Enero del 2013 a Diciembre del 2014.

Objetivos específicos

- 1.- Realizar el diagnóstico histopatológico de muestras de tejido de ganado bovino con lesiones aparentes a tuberculosis
- 2.- Identificar aislados microbiológicos de *M. bovis* de muestras de ganado bovino mediante la amplificación de la región del operón *mce-3*.
- 3.- Determinar la frecuencia, proporción y distribución de tuberculosis en ganado bovino de carne y leche

Material y métodos

Colecta de muestras

Se colectaron muestras de tejido de ganado bovino con lesiones granulomatosas sugestivas a TBB en dos rastros de Baja California durante el periodo de Enero del 2013 a Septiembre del 2014. El primero es un rastro tipo inspección federal 54 (TIF), en Mexicali y el segundo el rastro municipal de Ensenada (RME). Se realizó la inspección *post mortem* de acuerdo al manual de inspección sanitaria para ganado bovino sospechoso de TBB (SENASICA 2011a). Las muestras recuperadas fueron divididas en tres secciones para la realización de 1) análisis histopatológico, 2) cultivo bacteriológico e 3) identificación molecular. La presencia de lesiones granulomatosas se documentó considerando la siguiente información: fecha, identificación del animal, localización de la lesión, número de caso, género, fin zootécnico, peso, y municipio de procedencia.

Análisis histopatológico

Una porción de tejido bovino con lesiones granulomatosas fue fijada en formol tamponado al 10% y se procesó utilizando la técnica de parafina estándar, se cortaron secciones de cada muestra y se realizó el análisis histopatológico con la tinción Hematoxilina-Eosina, las secciones teñidas se examinaron bajo microscopio. Las muestras positivas a lesiones compatibles a una infección por micobacteria (granuloma, necrosis central, mineralización, presencia de células gigantes), fueron teñidas con la técnica Ziehl-Neelsen, para la observación de los bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR).

Aislados microbiológicos

La manipulación del tejido se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, se utilizaron instrumentos quirúrgicos estériles y una nueva superficie de corte para cada muestra, se seleccionó aproximadamente 2 g de tejido con lesión y material caseoso aledaño y se procedió a la descontaminación mediante el método Petroff (OIE 2012). Los sedimentos obtenidos se sembraron en medio de cultivo Stonebrink y se incubó durante un mínimo de ocho semanas a 37 °C. Los cultivos fueron examinados macroscópicamente a intervalos semanales durante el periodo de incubación para observar crecimiento.

Identificación molecular de micobacterias

Se realizó la extracción de DNA a partir del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo de Stonenbrink. Se tomó de 200 - 500 mg de masa bacilar y se homogenizó en 400 µL de solución de lisis (10mM Tris-HCl [pH 8.3], 2mM MgCl₂, 50 mM KCl). Se incubó 15 min a 95 °C para su inactivación, posteriormente se centrifugó 30 min a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo (Marcos et al. 1999).

Para determinar la especie, *M. tuberculosis* o *M. bovis*, se realizó la identificación, mediante la amplificación de la región del operón *mce-3* Incluyéndose DNA de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua nanopura. Los datos de identificación molecular se compararon -con los resultados obtenidos del cultivo.

RESULTADOS

Colecta de muestras

Se colectaron 319 muestras con lesiones granulomatosas sugestivas a TBB. El 70% (223/319) de las muestras se colectaron en el TIF y el 30% (96/319) en el RME. Todo el ganado del TIF proviene ranchos ganaderos de Mexicali, mientras que en el RME, el 16% (54/319) provino de Ensenada, el 10% (32/319) de Tijuana, el 3% (9/319) de Tecate y el 1% (3/319) de Rosarito. En total, el 60% (193/319) fueron muestras de bovinos de carne de razas Criollo, Cebú, Angus y Hereford; mientras que el 40% (126/319) restante fue ganado bovino lechero de la raza Holstein. El mayor número de muestras de ganado de carne fue del TIF con 83% (184/223), mientras que en el RME, el ganado de leche fue el predominante con 91% (87/96) (Tabla II).

Análisis y distribución histopatológica de los casos positivos

El análisis histopatológico con HE, identificó que el 70% (225/319) de las muestras resultaron con diagnóstico de micobacteriosis sugestiva (MS) de las cuales el 32% (104/319) provienen de ganado lechero y el 38% (121/319) de ganado de carne (Tabla II y III).

De las 225 MS el 57% (128/225) fueron positivas al BAAR diagnosticándose como micobacteriosis compatible (MC) de las cuales el 25% (57/225) corresponden a muestras de ganado lechero y el 32% (71/225) corresponden a muestras de ganado de carne,

continuando con la mayor frecuencia de lesiones encontradas en ganglios linfáticos de cabeza, en ganado de leche y de carne con el 51% (29/57, 36/71) (Tabla IV).

Tabla II. Lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino recolectadas en dos rastros de Baja California.

<i>Procedencia</i>	<i>Ganado Leche % (n)</i>	<i>Ganado Carne % (n)</i>	<i>Total % (n)</i>
Mexicali	12.2 (39)	57.6 (184)	69.9 (223)
Ensenada	14 (45)	2.2 (7)	16.3 (52)
Tijuana	9.7 (31)	0.3 (1)	10. (32)
Tecate	2.5 (8)	0.3 (1)	2.8 (9)
Rosarito	0.94 (3)	-	0.94 (3)
Total	39.5 (126)	60.5 (193)	100 (319)

Tabla III. Diagnóstico histopatológico (Hematoxilina-Eosina) de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina en ganado lechero y de carne

<i>Diagnóstico</i>	<i>Ganado Lechero % (n)</i>	<i>Ganado de Carne % (n)</i>	<i>Total % (n)</i>
Micobacteriosis	32.8 (104)	38 (121)	70.8 (225)
Actino/micosis/bacilosis	2.5 (8)	8.1 (26)	10.7 (34)
Hallazgos no significativos	1.8 (6)	5.6 (17)	7.2 (23)
Linfadenitis supurativa	1.6 (4)	1.6 (5)	2.8 (9)
Neumonía	0.62 (2)	1.6 (4)	1.8 (6)
Piogranuloma	0.31 (1)	1.6 (4)	1.6 (5)
Hiperplasia linfoide	-	1.6 (4)	1.6 (4)
Granuloma eosinofílico	-	0.94(3)	0.94 (3)
Absceso	-	1.6 (4)	1.6 (4)
Neoplasia	-	0.62 (2)	0.62 (2)
Coccidiodomicosis	-	0.62 (2)	0.62 (2)
Fibrosis pulmonar	0.31 (1)	-	0.31 (1)
Granuloma micótico	-	0.31 (1)	0.31 (1)
Total	39.5 (126)	60.5 (193)	100 (319)

Aislados microbiológicos e identificación molecular

Se realizó el cultivo microbiológico a las 225 MS, de las 128 positivas a BAAR se obtuvo un total 64 aislados microbiológicos, 50% (64/128), de las 97 MS que resultaron negativas a BAAR se obtuvo 49 aislados microbiológicos, 50% (49/97), sumando un total de 113 aislados microbiológicos, lo que representa un 50% (113/225) de recuperación. El 56% (63/113) fueron aislados de ganado lechero y el 44% (50/113) de ganado de carne. En el 37% (42/113) de los aislados microbiológicos, se realizó la confirmación molecular, el 60% (25/42) provienen de ganado lechero, de los cuales el 31% (13/42) se identificaron como *M. bovis*, distribuidos en 11 ranchos en tres municipios, en (Tijuana 5, en Mexicali 4 y en Ensenada 2), el 29% (12/42) de los aislados se identificó como *M. tuberculosis* distribuidos en 10 ranchos de, cuatro municipios del estado; cuatro de Ensenada, tres de Tijuana, dos de Mexicali y uno de Rosarito. En cuanto al 40% (17/42) de aislados de bovinos de carne se identificó el 31% (13/42) como *M bovis*, ubicados en 6 ranchos de Mexicali, y el 9.5% (4/42) como *M. tuberculosis*, distribuidos en cuatro ranchos (Mexicali, 3 y Ensenada, 1), la presencia de ambas especies se localizó en dos ranchos de Mexicali (Figura 7).

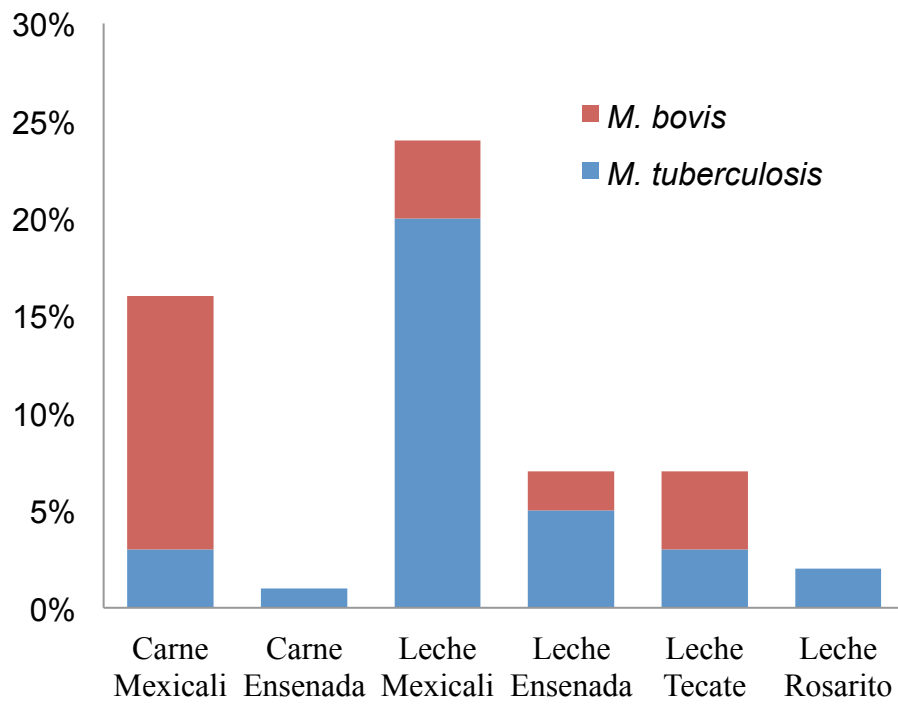


Figura 7. Identificación molecular de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en ganado de carne y leche de acuerdo a la ciudad de procedencia en Baja California.

DISCUSIONES

En este estudio los casos detectados como micobacteriosis compatible en la tinción Ziehl-Neelsen fue del 40% (128/319) cifra aproximada a lo reportado anteriormente en Baja California con un 49% (248/505) (Lopez-Valencia et al. 2010), a 10 años de este estudio se observa que la frecuencia de micobacteriosis en ganado bovino a la fecha es similar, esto pudiera ser debido a la falla en la vigilancia y la aplicación de las medidas de control de la enfermedad en este periodo de tiempo. Se observó que el 29% (94/319) de las lesiones granulomatosas resultaron no sugestiva a micobacteriosis, siendo el 36% (34/94) de estos casos a causa de Actinomicosis/Actinobacilosis, posicionándola como segunda causa de enfermedad granulomatosa en el ganado bovino y por lo tanto de importancia como enfermedad endémica en Baja California, estos resultados son similares a lo reportado en Argentina (Dubarry 2004). Adicionalmente el 24% (23/94) de las lesiones no se encontraron hallazgos significativos, el resto (39%, 37/94) eran lesiones a causa de otras enfermedades, por lo que la presencia de lesiones granulomatosas en ganado bovino puede ser a causa de diferentes etiologías además de la TBB.

En total, se obtuvo un 50% de recuperación de aislados microbiológicos, lo cual es mayor a lo reportado en otros estudios (Estrada Chávez et al. 2001; Morales 2005; Martínez-Vidal et al. 2011), pero menor a lo esperado, esto puede deberse a que el tiempo entre la recolección y la inoculación de las muestras fue de 7 - 365 días. La Organización Panamericana de la Salud, recomienda procesar las muestras

con la menor demora posible, idealmente dentro de las 4 horas siguientes a la recolección (OPS 2008).

La prevalencia de TBB en México varía de acuerdo con la región, en los estados fronterizos del norte, como Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León y Baja California, se reporta con 19.73%, 14.29%, 8.33% (mediante análisis histopatológicos) y 4.03% con zonas de hasta el 40% (mediante la prueba de la tuberculina) respectivamente (Lopez-Valencia et al. 2010; SENASICA 2011a). Con el análisis de identificación molecular se determinó la presencia de *M. bovis* en el 62% de las muestras y se detectó *M. tuberculosis* en el 38%. El ganado con infección por *M. tuberculosis* proviene de cuatro municipios, Mexicali, Tijuana, Rosarito y Ensenada, siendo este último en donde se registró el mayor número de casos. En México no existen reportes de infección por *M. tuberculosis* en el ganado bovino, por lo que su detección es un hallazgo importante, esto puede deberse a que en el país siguen siendo pocos estudios en donde se utilizan técnicas moleculares para la identificación de las especies de micobacterias y en algunos el número de muestras es muy reducido. En el estudio realizado por (Flores Popoca 2011) de 722 muestras de leche bovina recolectada en el estado de México el 3.5% resultaron positivos a BAAR, sin embargo no se realizaron análisis moleculares para el diagnóstico. En el estudio realizado por Morales y colaboradores (2005) de 176 muestras de ganglios de bovino embebido en parafina el 56.25% se identificaron molecularmente como microorganismos del complejo *M. tuberculosis*. Por otro lado 60 aislados microbiológicos provenientes de Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, Baja California, Durango y 58 provenientes de Ciudad Juárez, el 100% se reportó como

M. bovis (Cobos-Marín et al. 2005; Padilla-Campos 2011). En otros estudios similares en donde se colectaron de 60 aislados microbiológicos provenientes de Tlaquepaque Jalisco se identificaron molecularmente el 97% como *M. bovis* (Portillo-Gómez & Sosa-Iglesias 2011). La identificación molecular de *M. bovis* en ganado bovino en este estudio es de importancia tanto para la ganadería de la zona debido a las pérdidas económicas que TBB ocasiona, como para la salud pública por el riesgo potencial de dispersión de estas cepas a la población humana.

La identificación molecular de *M. tuberculosis* de este estudio coinciden con otros realizados en África y Asia (Prasad et al. 2005; Chen et al. 2009; Fetene et al. 2011), en donde la prevalencia de *M. tuberculosis* en ganado bovino, va desde el 4.7% hasta el 30.8%, probablemente como consecuencia al alto número de casos de TB en humanos a nivel mundial representando el 29% y 56% respectivamente (Fetene et al. 2011). Considerando lo anterior, el hecho de que se registre la presencia de *M. tuberculosis* en ganado bovino en Baja California, puede deberse a que es el estado con la mayor tasa de incidencia de TB en humanos en México. La infección por *M. tuberculosis* en el ganado se puede dar por la inhalación de los bacilos del suelo contaminado con esputo, orina o heces de humano o un animal con TB (Hutchings & Harris 1997). Por otro lado, Europa aporta solo el 4% de los casos de TB en humanos del mundo e igualmente ha reportado casos de *M. tuberculosis* en ganado bovino, con una frecuencia de hasta el 5.1% Ocepek et al., 2005, (Romero et al. 2011), por la transmisión de *M. tuberculosis* de trabajadores con TB activa que estuvieron en contacto con el ganado. Según los datos presentados la transmisión de

humano a bovino de forma accidental puede darse aunque existan pocos casos de TB en humanos y sin importar la región.

Otro hallazgo importante es la detección de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en cuatro ranchos de la zona, existen solo algunos casos en donde se ha detectado la co-ocurrencia de ambas especies por lo que la prevalencia de este tipo de casos es desconocida tanto en este estudio como en donde han sido reportados (Mishra et al. 2005; Prasad et al. 2005; Thakur et al. 2012).

CONCLUSIONES

La identificación de lesiones sugestivas a TBB en rastros, representa un componente fundamental en el programa nacional de erradicación de la TBB, ya que es posible obtener un diagnóstico tentativo de TBB, realizando el análisis *postmortem* de las lesiones mediante las tinciones de rutina Hematoxilina- eosina y Ziehl-Neelsen en ganado bovino.

La circulación de *M. bovis* y *M. tuberculosis* en el ganado en México presenta un gran desafío para el control de la tuberculosis en el país, por lo que deberían ser reforzadas las medidas de control destinadas a prevenir su la propagación, incluyendo la vigilancia de la correcta aplicación de los sistemas de vigilancia en el ganado.

Por lo anterior es de gran importancia la realización de más estudios para comprender plenamente la dinámica de la epidemiología de la infección de *M. tuberculosis* en el ganado en México.

Capitulo II

Caracterización molecular de *Mycobacterium bovis* aislados de humanos y ganado bovino en Baja California, México, mediante Secuenciación de Genoma Completo.

Resumen

En este estudio se determinó la diversidad genética de aislados de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovino y de humanos de Baja California México. Se utilizó la estrategia de secuenciación del genoma completo para obtener los genotipos de 172 aislados de *M. bovis* de los cuales 155 provienen de bovinos, y 17 de humanos. Se caracterizaron los espoligotipos *in silico* y se evaluaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) entre los aislados. Se identificaron 12 patrones de espilgotipos de *M. bovis* dentro del ganado bovino y humanos. Se detectaron dos patrones de espilgotipos predominantes tanto en el ganado como en los seres humanos (SB0145 y SB1040). El espilgotipo SB0145 representó el 59% (91 aislamientos) y el 65% (11 aislamientos) en bovinos y humanos, respectivamente, mientras que el espilgotipo SB1040 representó el 30% (47 aislamientos) y el 30% (5 aislamientos) de bovinos y humanos respectivamente. Todos los aislados de humanos coinciden con los patrones de espilgotipado observados en los aislados de bovino. Además todos los aislados de humanos comparten antepasados comunes con los aislados de *M. bovis* de ganado en Baja California basado en el análisis de SNP, lo que sugiere que los aislados de humanos están íntimamente relacionados genéticamente con los aislados de ganado. Es probable que la mayor parte de la tuberculosis humana causada por *M. bovis* en Baja California provenga de *M. bovis* que circula en el ganado de Baja California. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la importancia de la vigilancia y el control de la tuberculosis bovina en esta región.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, spoligotypes, secuenciación del genoma

Introducción

Mycobacterium bovis es uno de varios miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) y se sabe que es la especie responsable de la tuberculosis bovina (TBB). La TBB es una enfermedad zoonótica, la cual se distribuye en todo el mundo y que afecta a los mamíferos, incluidos los humanos (Pérez-Lago et al. 2014). En los humanos, el modo principal de infección es por ingestión de leche o productos lácteos no pasteurizados contaminados y por contacto directo con animales infectados (Cosivi et al. 1998; Cousins 2001). No obstante, se dispone de información limitada sobre la TBB y la tuberculosis humana causada por *M. bovis* en México (Tabla V).

En la industria ganadera mexicana, se estima que TBB causa una pérdida anual de \$ 450 millones de dólares, principalmente a la eliminación de ganado infectado (SAGARPA 2011b). Se estima que la prevalencia de TBB en el ganado lechero es del 16% en el país. Sin embargo, se han reportado tasas de prevalencia más altas (hasta 40%) en las regiones de Baja California (Lopez-Valencia et al. 2010). En México, el porcentaje medio de HTBMB es 7,6% (rango 0% -31,6%) (Müller et al. 2013). Los casos sospechosos de tuberculosis (TB) en seres humanos se determinan principalmente por microscopía y cultivo de micobacterias, este último solo se elabora si es ordenado por el médico y solo para los pacientes con alto riesgo de resistencia a fármacos o si el paciente está experimentando fracaso al tratamiento. Además, la mayoría de los laboratorios sólo utilizan un medio de cultivo que contiene glicerol (es decir, Löwenstein-Jensen), en donde típicamente *M. bovis* no

puede crecer durante el aislamiento primario, ya que este organismo requiere la presencia de piruvato para un crecimiento óptimo. Además, en México, sólo un pequeño número de laboratorios tienen los procedimientos moleculares para identificar CMT a nivel de especie.

Los esfuerzos en el campo de la genómica micobacteriana en los últimos años y la disponibilidad de secuencias del genoma completo de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluyendo *M. bovis* (Cole et al. 1998; Garnier et al. 2003), han permitido abordar cuestiones relativas a los rasgos genéticos del bacilo, como la resistencia a los fármacos y la susceptibilidad (Walker et al. 2015). Se han descrito varios métodos para genotipar CMT, incluyendo *M. bovis*. El espoligotipado ha sido uno de los métodos más comunes para el cribado a gran escala, ya que puede ser utilizado para analizar la distribución de cepas de *M. bovis* y puede ser utilizado para comparar aislados entre diferentes laboratorios, países y para la caracterización de cepas en México lo cual está bien documentado en la literatura (Zumárraga et al. 2013). La metodología se utiliza para determinar la diversidad genética por amplificación por PCR de regiones altamente polimórficas, de repetición directa (DR) que flanquean la secuencia de inserción IS6110 en el cromosoma de CMT. Esta detección considera la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras de ADN específicas en la región genómica DR como patrón para un aislado particular. *M. bovis* tiene un patrón característico de ausencia para cinco espaciadores en la región 3' DR (39 a 43) (Kamerbeek 1997).

Recientemente, las publicaciones han demostrado el valor del análisis de SNP utilizando la secuenciación del genoma completo (SGC) para rastrear la enfermedad y para comprender la fuente de brotes locales (Glaser et al. 2016; Kamath et al. 2016). Este notable el poder discriminatorio y no sólo es útil para el control local de enfermedades, sino que puede utilizarse para establecer y evaluar la política de control de enfermedades a nivel nacional e internacional (Kao R et al. 2016; Crispell et al. 2017)

Baja California (B.C.) es el estado mexicano con la frontera terrestre más transitada en el mundo, con un estimado de 50 millones de cruces humanos legales por año, por lo que es una región altamente susceptible al movimiento de patógenos. Es debido a esto que se piensa que pudiera ser una de las razones principales de que B.C. es el estado mexicano con mayor incidencia de TB en los seres humanos (Secretaría de Salud México 2015) y tiene una de las más altas prevalencias de TBB reportadas en el país (Lopez-Valencia et al. 2010). En este estudio se utilizó la SGC para describir la diversidad mediante espoligotipos de *M. bovis*, comparando a B.C. con otras regiones de México y el mundo, y posteriormente se utilizó el análisis de SNP para caracterizar y comparar los aislados de humanos y ganado dentro de B.C.

Objetivo General

Determinar la diversidad genética mediante la comparación de los espoligotipos y SNP de las cepas de *M. bovis*, de ganado bovino y de humanos de Baja California.

Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar histopatológicamente tejido de ganado con sospecha de tuberculosis bovina en rastros de Baja California
- 2.- Obtener aislados microbiológicos de *M. bovis* procedentes de ganado bovino
- 3.- Identificar molecularmente mediante la amplificación de una región del operón *mce-3* para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M bovis* en ganado bovino.
- 4.-Determinar la diversidad genética mediante la comparación de los espoligotipos y SNP de los aislados microbiológicos de *M. bovis*.

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo en el estado de Baja California en donde participaron múltiples instituciones: Escuela de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), UABC, Rastro Municipal de Ensenada, Laboratorio Estatal de Tuberculosis, Hospital General, Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana y Veterinary Services Laboratories Iowa.

Declaración de Ética

Todos los procedimientos de manipulación de los animales y de toma de muestras se llevaron a cabo siguiendo las directrices de las técnicas locales oficiales aprobadas para el cuidado de los animales, incluyendo: el cuidado humanitario de los animales durante la movilización, estipulaciones de salud animal y las características de los animales durante el transporte (NOM-024-ZOO- 1995; NOM-051-ZOO 1995); aprobado por el comité institucional de ética animal que está representado por el Grupo Académico de Salud Animal y el Grupo Académico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas; ambos parte del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

Población de estudio y obtención de muestras

Muestras de aislados microbiológicos de humanos

Para este estudio, Laniado Laborín y colaboradores 2014, nos proporcionó 27 aislados microbiológicos de *M. bovis* de humanos provenientes pacientes con diagnóstico confirmado de TB pulmonar de muestras clínicas (esputo) del 2011 al 2013, sin historial médico de contacto con ganado bovino, los cuales recibieron tratamiento en el Laboratorio Estatal de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana en el estado de Baja California Se contó con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes estudiados previa explicación de los objetivos y procedimientos del proyecto. Aprobado por el comité de bioética del Hospital General de Tijuana B.C. Estas son las muestras publicadas en el artículo: Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, México (Laniado-Laborín et al. 2014).

Se tomó una porción de los 27 aislados microbiológicos y fueron enviados al Laboratory National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, donde se recultivaron y secuenciaron.

Muestras de ganado bovino

Se colectaron muestras de tejido de ganado bovino con lesiones sugestivas a TBB, en dos rastros de Baja California, de Agosto a Noviembre del 2015. El primer rastro fue el Rastro Tipo Inspección Federal 54 en Mexicali, B.C. El segundo fue el Rastro Municipal de Ensenada B.C. donde se sacrifica ganado proveniente de Ensenada, Tijuana, Tecate, Rosarito y Mexicali.

La inspección *postmortem* se realizó de acuerdo a lo que establece el Manual de inspección sanitaria para ganado vacuno sospechoso de tuberculosis (SENASICA 2011b). Las muestras decomisadas se colocaron en un envase estéril con cloruro de sodio al 0.9% para su posterior cultivo bacteriológico y análisis molecular, previamente rotulado. En el caso de obtener más de una muestra de un mismo animal esta se colocó en el mismo envase, ya que la unidad de análisis de resultados se refiere a animales y no a piezas anatómicas. Se realizó un reporte el cual incluyó la presencia de lesiones granulomatosas, el área de su localización (ganglios linfáticos, cavidad torácica, pulmón, cavidad abdominal, hígado, riñones y múltiples tejidos), número de caso, fin zootécnicos y estado de procedencia. Todas las muestras se almacenaron en el Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular (MEEL), UABC, hasta que se realizaron análisis de cultivo y secuenciación de genoma completo, los cuales se llevaron a cabo en los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL), Iowa, EE.UU.

Análisis histopatológico

Una porción de tejido bovino con lesiones granulomatosas fue fijada en formol tamponado al 10% y se procesó en Laboratory National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, utilizando la técnica de parafina estándar, se cortaron secciones de cada muestra y se realizó el análisis histopatológico con la tinción Hematoxilina-Eosina, las secciones teñidas se examinaron bajo microscopio. Las muestras positivas a lesiones compatibles a una infección por micobacteria (granuloma, necrosis central, mineralización, presencia de células gigantes), fueron

teñidas con la técnica Ziehl-Neelsen, para la observación de los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Aislados microbiológicos

Ganado bovino

Los aislados microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratory National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa. Solo para las muestras de ganado bovino.

La manipulación del tejido se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, se utilizaron instrumentos quirúrgicos estériles y una nueva superficie de corte para cada muestra, se seleccionó aproximadamente 2 g de tejido con lesión y material caseoso aledaño y se procedió a la descontaminación mediante el método Petroff. Los sedimentos obtenidos se sembraron en medio de cultivo Stonebrink y se incubó durante un mínimo de ocho semanas a 37 °C. Los cultivos fueron examinados macroscópicamente a intervalos semanales durante el periodo de incubación para observar crecimiento.

Humanos

La manipulación de los aislados microbiológicos se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar nivel 3 (BSL3), se utilizaron instrumentos estériles, para tomar una porción del crecimiento y fueron sembrados en medio de cultivo Stonebrink, se incubó durante un mínimo de ocho semanas a 37 °C. Los cultivos

fueron examinados macroscópicamente a intervalos semanales durante el periodo de incubación para observar crecimiento.

Análisis genético

El análisis genético, extracción de ADN y la identificación molecular se realizó en Laboratory National Veterinary Services Laboratories

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó directamente de los aislados microbiológicos de las muestras clínicas bajo condiciones de BSL3. La extracción de ADN se realizó utilizando 500 mg de la masa bacilar homogenizados con 100 μ L solución de lisis (10mM Tris-HCl [pH 8.3], 2mM MgCl₂, 50 mM KCl). La muestra se incubó a 95° C por 15 min, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min, y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y etiquetado. Se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis (Marcos 1999). La calidad y cantidad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*®.

Identificación molecular de *M. bovis*

Las muestras de ADN obtenidas de aislados clínicos se identificaron mediante la amplificación de una región del operón *mce-3*, el cual permite diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Para lo cual se realizó una PCR multiplex con tres cebadores en un volumen total de 25 μ L, la cual consiste de 2.5 μ L de ADN, 25 pmol de cada primer, 200 mM de cada dNTPs, 1.5 U de *Taq* ADN

polimerasa, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 0.01% (w/v) gelatina. El perfil de temperatura fue de un ciclo de 94 °C x 5 min, seguido de 30 ciclos, de 94 °C x 1 min, 52.3 °C x 1.5 min, y 72 °C x 1 min y un ciclo final de 72 °C x 5 min. La calidad y cantidad de los productos amplificados se evaluó en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*®. Si la cepa se identificó como *M. tuberculosis* amplificó un producto de 337 pb, mientras que *M. bovis* amplificó un producto de 168 pb (Bakshi et al., 2005). Se incluyó en todas las PCRs la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua nanopura grado molecular. Los datos de identificación molecular se compararon con los resultados obtenidos del cultivo microbiológico

Secuenciación de Genoma Completo

La secuenciación de genoma completo se llevó a cabo en el NVSL. Se prepararon muestras de ADN (10 ng) para la secuenciación con el kit Nextera XT DNA Library Prep, (Illumina) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las bibliotecas genómicas se normalizaron y se ejecutaron en un secuenciador (Illumina MiSeq) generando 2 x 250-bp con el método Paired-End. El análisis de secuencia se realizó independientemente por el grupo MEEL y NVSL. El grupo MEEL realizó controles de calidad y espoligotipado, y NVSL llevó a cabo controles de calidad, alineación, espoligotipado y análisis SNP.

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se llevó a cabo en el Laboratorio de Epidemiología molecular de la UABC.

Espoligotipos

Mediante el programa *SpoTyping-v2.0-commandLine* (Xia et al. 2016) <https://github.com/xiaeryu/SpoTyping/releases> el cual predice el espoligotipo de aislados de CMT basados en los resultados de las lecturas de cada una de las secuencias de genoma completo, obtenido por la plataforma Illumina MiSeq *SpoTyping* se implementa con el lenguaje Python y el algoritmo BLAST. Este programa acepta la entrada de lecturas de archivos de un solo extremo o secuencia de pares de extremo en formato FASTQ. Se ejecutó con `-MIN` (minimum number of error free hits to sport presence of a spacer) de 5 hits y `-Min_RELAX` (minimum number of error-tolerant hits to sport presence of a spacer) de 6 hits (Xia et al. 2016) El programa da como resultado un código binario y octal el cual se comparó con la base de datos de espoligotipos de *M. bovis*. Además se utilizó el programa *SpolPred* www.pathogenseq.org/spolpred.on el propósito de corroborar y comparar los resultados del espoligotipo (Coll et al. 2012). Los códigos resultantes de los programas *SpoTyping-v2.0* y *SpolPred* se convirtieron a un patrón de espoligotipo utilizando <http://www.mbovis.org/>, en donde se elige la opción de base de datos, posteriormente la opción obtener el número SB a partir de un solo patrón de espoligotipo, se coloca el código binario dentro de la celda donde se especifica, y se selecciona la palabra buscar, dando como resultado el patrón SB de cada aislado.

Polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs)

Las lecturas se obtuvieron del secuenciador (Illumina MiSeq) en formato FASTQ, las cuales se analizaron usando las herramientas bioinformáticas de NVSL que está disponible en <https://github.com/USDA-VS>. Las lecturas se alinearon con la referencia de *M. bovis AF2122/97* (NC_002945) usando Borrows-Wheeler Aligner (BWA) programa Samtools (Li et al. 2009). Los archivos BAM se procesaron usando el flujo de trabajo de "buenas prácticas" de Genome Analysis Toolkit (GATK). SNPs fueron calculados utilizando GATK HaplotypeCaller con ploidía establecido en 2 SNPs de salida a la variante de archivos de llamada (VCF) 32, 3334. PPE-PGRS y la repetición de las regiones fueron filtradas, así como las calidades de los SNPs $QUAL > 150$ y la homoplastia ocasional SNP. Para determinar aislamientos mixtos, SNPs se manejó el procesamiento de un organismo diploide (por defecto ploidía establecido en 2). Cuando la ploidía se estableció en 2, un conteo de alelos (AC) se utilizó como 1 o 2 para cada SNP. Si las lecturas alineadas tenían múltiples números de referencia y variantes alternativas en una posición, GATK informó un $AC = 1$ que representa sólo 1 alelo diferente de la referencia o una llamada heterogénea para un organismo haploide. Sin embargo, cuando la gran mayoría de las variantes eran la alternativa, $AC = 2$, que representa 2 alelos diferentes de la referencia o para un organismo haploide una llamada de consenso en todas las lecturas que sugieren un solo genotipo. Para determinar un posible aislado mixto, se determinó el número total de posiciones de alta calidad comparando aislados estrechamente relacionados. Si una muestra tuviera una llamada de $AC = 1$ en una posición de alta calidad (determinada por los aislados estrechamente relacionados), esta posición sería identificada como una posible infección mixta

usando las directrices de la Unión de Ciencias Puras y Aplicadas para bases incompletamente especificadas. Los aislados se clasificaron en grupos manejables identificando los SNPs de alta calidad que eran únicos en un grupo particular de aislamientos. Los resultados se informaron en tres formatos, un archivo alineado FASTA, un archivo delimitado por tabuladores con la ubicación de posición y SNPs agrupados y ordenados; y un árbol filogenético creado mediante el uso de RAxML Utilizando el modelo GTRCAT con la configuración predeterminada (Stamatakis 2014). Los SNPs parsimoniosamente informativos fueron validados visualmente utilizando Integrated Genomics Viewer (Robinson et al. 2011) Finalmente, la exactitud del árbol filogenético se confirmó utilizando la tabla SNP validado.

RESULTADOS

Colecta de muestras

Ganado bovino

Se obtuvo un total de 189 muestras de ganado bovino con lesiones que sugerían una infección por TBB. La mayoría de las muestras de ganado fueron recolectadas de la instalación de rastro municipal de Ensenada (RME) (135 muestras). Los animales sacrificados en el RME provenían de Ensenada (n= 86 muestras), Tijuana (n=48 muestras) y Tecate (n=1). Las restantes muestras (54 muestras) fueron recolectadas de un rastro tipo inspección federal en Mexicali, del TIF todos los bovinos provenían de Mexicali (Tabla V).

Análisis histopatológico

El 90.4% (170/188) de las muestras resultaron con diagnóstico de micobacteriosis compatible (MC) de las cuales el 81.2% (138/170) provienen de ganado lechero y 18.8% (32/170) de ganado de carne, el restante 9.6% (18/188) se dividió en: absceso 0.5%, absceso pulmonar 1.06%, actinomicosis/actinobacilosis 1.6%, bronconeumonía 0.5%, carcinoma 0.5%, granuloma micótico 2.6% , lipogranuloma 0.5% y Rhodococcus 2.1% (Tabla VI).

Tabla V. Lesiones sugestivas a tuberculosis en ganado bovino recolectadas en dos rastros de Baja California.

<i>Procedencia</i>	<i>Ganado Leche</i> <i>% (n)</i>	<i>Ganado Carne</i> <i>% (n)</i>	<i>Total</i> <i>% (n)</i>
Mexicali	5.3 (10)	23.4 (44)	28.7 (54)
Ensenada	43.6 (82)	1.6 (3)	45.2 (85)
Tijuana	25.5 (48)	-	25.5 (48)
Tecate	0.5 (1)	-	0.5 (1)
Total	75 (141)	22 (47)	100 (188)

Tabla VI. Diagnóstico histopatológico de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina

<i>Diagnóstico</i>	<i>Ganado Lechero</i> % (n)	<i>Ganado de Carne</i> % (n)	<i>Total</i> % (n)
Micobacteriosis	73.4 (138)	17 (32)	90.4 (170)
Actino/micosis/bacilosis	0.5 (1)	1.6 (3)	1.6 (3)
Absceso	-	0.5 (1)	0.5 (1)
Absceso pulmonar	-	1.06 (2)	1.06 (2)
Bronconeumonía	-	0.5 (1)	0.5 (1)
Carcinoma	0.5 (1)		0.5 (1)
Granuloma micótico	-	2.6 (5)	2.6 (5)
Lipogranuloma	0.5 (1)		0.5 (1)
Rhodococcus		2.1 (4)	2.1 (4)
Total	75 (141)	25 (48)	100 (188)

Aislados microbiológicos

Ganado bovino

De las 170 muestras con resultado de micobacteriosis compatible, se logró obtener el 92.3% (157) aislados microbiológicos, de los cuales el 99.4% (155) se identificó molecularmente *M. bovis*, y en un caso se obtuvo crecimiento mixto identificándose *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium fortuitum* (*M. farcinogenes* o *M. senegalense*).

Humanos

De los 27 aislados microbiológicos enviados para su recultivo solo se logró obtener crecimiento en el 63% (17), de los cuales el 100% (17), se identificó molecularmente como *M. bovis* (Laniado-Laborín et al. 2014).

Secuenciación de genoma completo

Se obtuvieron 172 Secuencias de Genoma Completo de aislados microbiológicos de *M. bovis*. 155 (90 %) provenientes de ganado bovino y 17 (10%) de humanos. De las 45 muestras restantes en dos no se logró realizar el ensamblaje debido a baja calidad de la secuenciación y las restantes no se secuenciaron debido a la falta de crecimiento en el medio de cultivo. La profundidad media de cobertura fue 94X con un rango de 51 - 150X

Espoligotipado

Mediante el uso del programa *SpoTyping*, se identificaron un total de 12 patrones de espoligotipos; dos de los cuales eran huérfanos, por lo que se registraron en Mbovis.org (SB2468 y SB2469). Los 12 patrones de espoligotipo identificados se presentaron en el ganado, y tres de estos patrones se encontraron en los seres humanos (Tabla suplementaria 2). El 89% de los espoligotipos encontrados en el ganado se distribuyeron en dos espoligotipos principales: SB0145 59% (92) y SB1040 30% (47). El 11% restante (17) se distribuyó entre los otros diez espoligotipos. Por último, los dos nuevos espoligotipos registrados, (SB2268 y SB2469) representaron el 1.2% restante (Tabla VII, Figura 8).

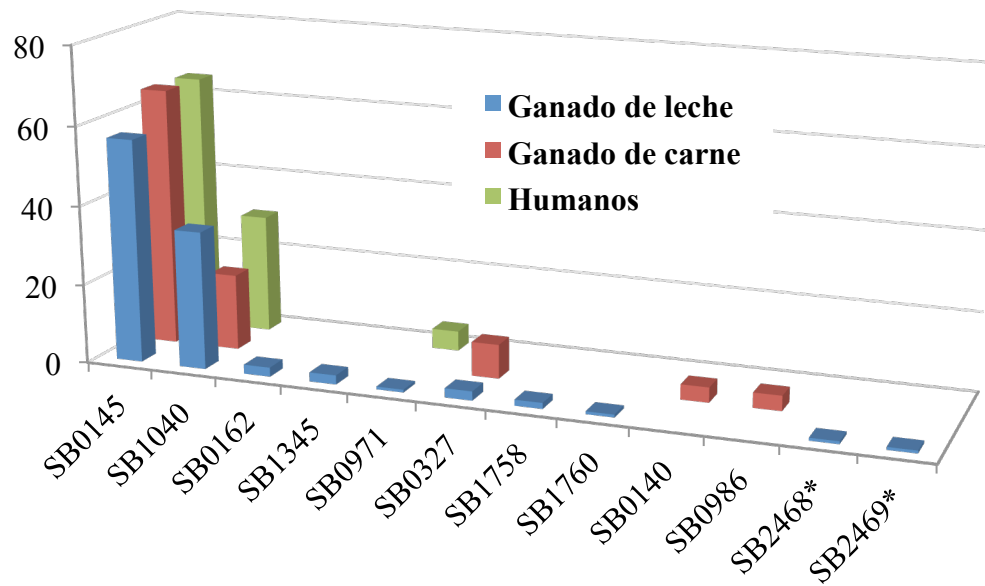


Figura 8. Frecuencia de patrones de espoligotipo de *Mycobacterium bovis* en ganado y humano. *Nuevo patrón de espoligotipado.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Con el fin de reconstruir la historia filogenética de los aislados *M. bovis* del estudio se generó un árbol filogenético utilizando los datos de SNPs (Figura 9). Este árbol utilizó la cepa BCG como grupo fuera porque sólo el complejo clonal europeo 1 y 2 se identificó en los aislados de B.C. Para tal perspectiva, se incluyeron cepas de referencia comúnmente disponibles: *AN5*, el aislado utilizado para producir PPD; *AF2122/97*, la primera cepa de *M. bovis* secuenciada; *Ravenala*, una cepa comúnmente utilizada en estudios de patogenicidad, y *95-1315* un aislado de venado de Michigan comúnmente utilizado como una cepa de desafío en estudios de vacunas. Curiosamente, la cepa *95-1315* se agrupó dentro del C.C. de ganado y cepas humanas, esto no es sorprendente ya que EE.UU. y México tienen una larga historia de comercio de ganado, y la mayoría de los bovinos lecheros introducido en B.C. a finales de 1800 vino de los Estados Unidos. Los aislados de B.C se agruparon en siete grupos principales. Los grupos 2, 3, 4 y 5 comparten el mismo antepasado común con la cepa de referencia de ciervo de Michigan y todos han divergido de 45 a 60 SNPs desde que compartieron ese antepasado común, sugiriendo una fuente puntual de introducción de esta cepa en B.C. hace muchos años. El grupo 6 comparte un antepasado común ligeramente mayor del mismo linaje que los grupos 2, 3, 4 y 5. Finalmente, el grupo 7 es el grupo más lejano relacionado en el clon europeo 1 y es el más diverso entre los aislados. Los aislados de *M. bovis* humanos se acoplan firmemente con los aislados de ganado y se propagan por todo el árbol, lo que sugiere que las cepas de *M. bovis* aisladas de humanos en este estudio derivan de aislados de ganado lechero en B.C. Los aislados de *M. bovis* en humanos

promediaron 13.5 SNPs con un rango de 4-28 desde que compartieron antepasados comunes con diferentes aislados de ganado.

Se observó evidencia de cepas mixtas en once aislados de ganado bovino, tres de estos aislados (16-0231, 16-0346 y 16-0461) se mezclaron con cepas tan divergentes que habrían estado en múltiples grupos en las tablas SNP, y representadas en nodos ancestrales en el árbol filogenético, por lo tanto no fueron incluidas. Los ocho restantes que contenían cepas mixtas estrechamente relacionadas, se identifican con fuente color verde y llamadas IUPAC ambiguas SNP encontradas en el grupo 1, 5 y 6 en las tablas SNP. Curiosamente, ninguno de los aislamientos humanos tenía evidencia de infección mixta. La Tabla suplementaria 4 contiene información de SNP para cada uno de los grupos, que describen la posición y la anotación de genes de cada SNP parsimoniosamente informativo.

Los aislados de B.C. fueron agregados en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) Short Read Archive (SRA) con el número Bioproject PRJNA384996.

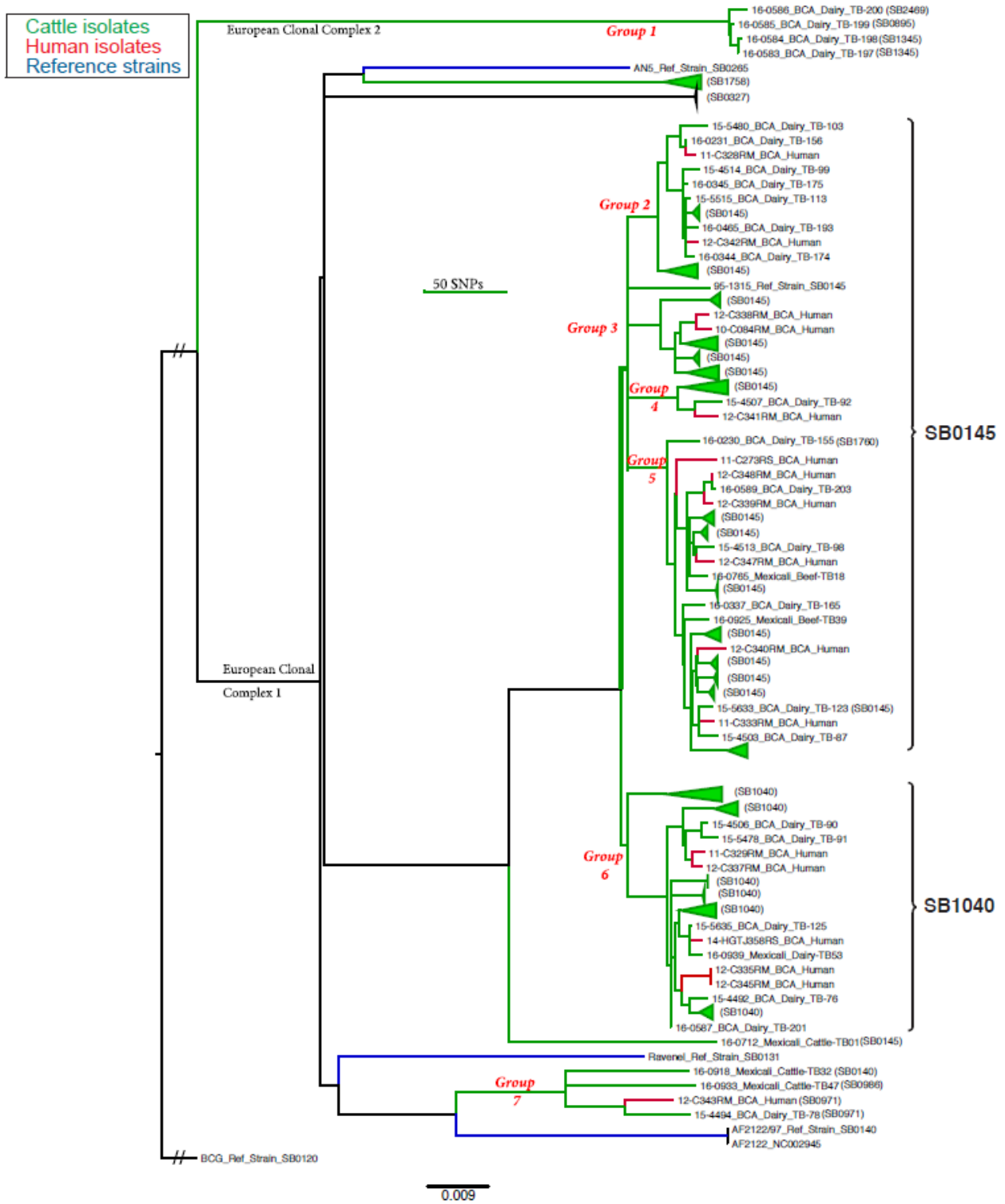


Figura 9. Árbol filogenético generado con RAxML de Secuencias de Genoma Completo de 155 aislados bovinos y 17 aislados humanos todos de Baja California, México. Se incluyó cuatro cepas de referencia (BCG, Ravenel, AN5, y 95-1315).

DISCUSIONES

En cuanto a la direccionalidad de la transmisión de los aislados de *M. bovis* entre bovinos y humanos, el análisis filogenético (Figura 9) confirmó que las cepas de *M. bovis* aisladas en humanos tienen un origen bovino al intercalarse entre los aislados de ganado bovino. Ninguno de los pacientes informó contacto con ganado sugiriendo que los productos lácteos comprados son la fuente de sus infecciones y no el resultado de infecciones adquiridas ocupacionalmente. A pesar de solo contar con 17 aislados provenientes de humanos para el análisis, fue sorprendente que no identificaran aislados de *M. bovis* mixtos.

El queso pudiera ser la fuente de infección importante, ya que la leche se agrupa de muchas vacas y el consumo se produce con el tiempo. Será interesante observar si la recuperación de una sola cepa *M. bovis* en humanos se mantiene con el tiempo. 11/172 (6.3%) de los aislados de ganado tenían evidencia de infección mixta. Esto apoya la epidemiología conocida en la región, ya que se ha producido la consolidación de la ganadería lechera y existe una alta prevalencia de TBB.

Con respecto a los patrones de espoligotipos asignados en B.C. se encontró que los tres patrones de espoligotipos observados en *M. bovis* provenientes de los seres humanos coincidieron con los espoligotipos de ganado; SB0145 (65%, 11), SB1040 (30%, 5) y SB0971 (5%, 1) (Tabla VII, Figura 8). Informes anteriores mencionan que estos tres patrones de espoligos se encontraron en humanos y ganado de México (Tabla VIII) y en los Estados Unidos, corroborando la importancia zoonótica de estas cepas de *M. bovis* (Rodwell et al. 2008; Milian-Suazo et al. 2016).

El espoligotipo más frecuente reportado en este estudio fue SB0145, que se encontró en bovinos de Ensenada, Tijuana y Mexicali (todos los municipios muestreados, excepto Tecate). Un resultado muy interesante dado que este espoligotipo (SB0145) ha sido descrito como el espoligotipo de *M. bovis* más frecuente en los Estados Unidos (Smith & Hilscher 2003; Milián-Suazo et al. 2012; Milian-Suazo et al. 2016) reportado en humanos, ganado, fauna silvestre, cerdos salvajes, ciervos y otras especies (Milian-Suazo et al. 2016). Esto sugiere que el flujo de aislados de micobacterias entre B.C. y Estados Unidos puede deberse a los atributos geográficos de B.C. frontera con los Estados Unidos. Este espoligotipo también ha sido reportado en otras ciudades mexicanas y otros países como Argentina, Brasil, Francia, Nueva Orleans y el Reino Unido (Smith & Hilscher 2003; Milian-Suazo et al. 2016) (Tabla VIII y IX).

El espoligotipo SB1040 se encontró en ganado de los cuatro municipios y se informó en el año 2010 como el segundo espoligotipo más frecuente en el condado de San Diego US 36. Este espoligotipo también ha sido reportado en países latinoamericanos, como Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Costa Rica (Smith & Hilscher 2003) y diferentes ciudades mexicanas (Milián-Suazo et al. 2012) (Tabla VIII). Por otra parte, es uno de los espoligotipos más comúnmente encontrados en Corea del Sur 40. Basado en la filogenia, SB1040 (es espoligotipo descendiente de SB0145) derivado muy probablemente de B.C. El patrón de espoligotipo SB0145 pertenece a una cepa de aproximadamente 50 SNPs anteriores, lo que sugiere que el desarrollo de este patrón de espoligotipo en otros países son el resultado de la homoplasia, una ocurrencia común con spoligotyping.

El espoligotipo SB0971, sólo se encontró en Tijuana. Los tres espoligotipos descritos anteriormente (SB0145, SB1040 y SB0971) se han reportado previamente en B.C. 38. Los espoligotipos SB0327, SB0140 y SB0986 se han encontrado previamente en bovinos del municipio de Mexicali, pero también se han descrito en otras regiones de México (Rodwell et al. 2010; Milián-Suazo et al. 2012; Zumárraga et al. 2013). Los espoligotipos SB1345, SB1758 y SB1760 se han sido reportados antes en seres humanos del condado de San Diego, los E.U, (Milian-Suazo et al. 2016). En este estudio se encontraron estos espoligotipos solo en el ganado, que provenía de Tijuana y Ensenada.

Curiosamente, el espoligotipo SB0162 sólo se encontró en el ganado de Tijuana, y es reportado como el más predominante en Bélgica (Humblet et al. 2010). Es importante notar que SB0162 ha perdido los primeros 24 espaciadores, haciendo difícil determinar el espoligotipo padre

A pesar de que en la literatura se ha descrito una gran diversidad de patrones de espoligotipos de cepas de *M. bovis* de ganado bovino en México (Milián-Suazo et al. 2012), se observó una menor diversidad de espoligotipos. Esto puede ser probable a que todas las muestras se obtuvieron en un solo estado mexicano, y la geografía de B.C. limita el comercio rutinario de ganado con otras regiones de México.

Los espoligotipos SB1758, SB1760 y SB1345, que se reportaron en seres humanos de San Diego, Estados Unidos de 2004 a 2007 (Rodwell et al. 2010), corresponden con aislados *M. bovis* de bovinos de Tijuana y Ensenada en B.C. encontrados durante este estudio.

CONCLUSIONES

Mientras que las técnicas de genotipado, como IS6110 y MIRU-VNTR, no son adecuadas para plataformas tecnológicas de secuenciación corta, el espoligotipado *in silico* ofrece la oportunidad de obtener un espoligotipo con un mínimo esfuerzo y alta precisión siempre que la profundidad de cobertura sea adecuada.

Este estudio muestra que *M. bovis* está circulando a niveles elevados y no controlados en B.C. en ganado lechero y parece que se transmite regularmente en la población humana urbana local. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para explicar con mayor claridad los mecanismos de transmisión que difunden TBB en esta región.

Tabla IV. Diagnóstico histopatológico, cultivo microbiológico, e identificación molecular en ganado lechero y de carne.

	Tinción HE (MS)	Tinción ZN (+)	Tinción ZN(-)	M ZN (+)	M ZN (-)	<i>IM Mb</i>	<i>IM Mt</i>
Ganado lechero	104	57/104	47/104	40/57	23/47	13/63	12/63
Ganado de carne	121	71/121	50/121	24/71	26/50	6/50	4/50

HE: Hematoxilina-Eosina; MS: Micobacteriosis sugestiva; ZN: Ziehl-Neelsen; M: Crecimiento cultivo microbiológico; IM: Identificación molecular (amplificación *mce-3*); *M.b.* *Mycobacterium bovis*; *M.t.* *Mycobacterium tuberculosis*

Tabla XIX. Número de haplotipos y mutaciones observadas en comparación con las cepas de referencia *M.tuberculosis H37Rv* y *M.bovis AF2122/97*

Haplotipos	Bovinos de leche	Bovinos de carne	Humanos	Mutación/gen				
Haplotipo 1	54	11	10	T76A <i>eis</i> *				
Haplotipo 2	20	2	0	T76A <i>eis</i> *	G162S <i>pncA</i>	S8A <i>panD</i>		
Haplotipo 3	11	2	4	T76A <i>eis</i> *	S8A <i>panD</i>	E91G <i>rpoA</i>		
Haplotipo 4	5	3	0	T76A <i>eis</i> *	P226A <i>Eis</i>			
Haplotipo 5	6	0	0	T76A <i>eis</i> *	C2F <i>rrs</i>			
Haplotipo 6	2	0	0	T76A <i>eis</i> *	L41P <i>nat</i>			
Haplotipo 7	3	0	0	T76A <i>eis</i> *	L328V <i>emrB</i>			
Haplotipo 8	3	0	0	A76T <i>eis</i> **	P958Q <i>embA</i>	L178F <i>emrB</i>		
Haplotipo 9	1	1	0	T76A <i>eis</i> *	G162S <i>pncA</i>			
Haplotipo 10	2	0	0	T76A <i>eis</i> *	W356R <i>embC</i>			
Haplotipo 11	0	2	0	T76A <i>eis</i> *	M579L <i>embC</i>	V73A <i>katG</i>		
Haplotipo 12	0	2	0	T76A <i>eis</i> *	C2F <i>rrs</i>	G274A <i>Rv1258c</i>		
Haplotipo 13	1	0	1	T76A <i>eis</i> *	S8A <i>panD</i>	V191A <i>Rv3239c</i>	E91G <i>rpoA</i>	
Haplotipo 14	2	0	0	T76A <i>eis</i> *	R927H <i>embC</i>	P484S <i>ethA</i>		
Haplotipo 15	0	1	1	T76A <i>eis</i> *				
Haplotipo 16	2	0	0	T76A <i>eis</i> *	G162S <i>pncA</i>	A724V <i>rpoA</i>		
Haplotipo 17	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	F442 <i>embA</i>	S8A <i>panD</i>	E91G <i>rpoA</i>	
Haplotipo 18	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	G162S <i>pncA</i>	S8A <i>panD</i>	T1036I <i>embC</i>	
Haplotipo 19	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	R231Q <i>ndh</i>			
Haplotipo 20	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	Q435R <i>ndh</i>			
Haplotipo 21	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	A353T <i>srnR</i>	S8A <i>panD</i>		

Haplotipo 22	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	R231Q <i>ndh</i>	V32A <i>tlyA</i>		
Haplotipo 23	0	1	0	T76A <i>eis</i> *	R359W <i>Eis</i>			
Haplotipo 24	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	R173S <i>Eis</i>	S8A <i>panD</i>	E91G <i>rpoA</i>	
Haplotipo 25	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	P226A <i>Eis</i>	A132V <i>gyrA</i>		
Haplotipo 26	0	0	1	T76A <i>eis</i> *	A277P <i>gyrB</i>			
Haplotipo 27	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	P226A <i>Eis</i>	A277P <i>gyrB</i>		
Haplotipo 28	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	P226A <i>Eis</i>	S8A <i>panD</i>	V191A <i>Rv3239c</i>	E91G <i>rpoA</i>
Haplotipo 29	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	R1010I <i>Rv3239c</i>			
Haplotipo 30	1	0	0	A76T <i>eis</i> **	L178F <i>emrB</i>			
Haplotipo 31	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	S8A <i>panD</i>		M86I <i>mmr</i>	
Haplotipo 32	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	Q435R <i>ndh</i>	S8A <i>panD</i>	M86I <i>mmr</i>	E91G <i>rpoA</i>
Haplotipo 33	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	L41P <i>nat</i>	V290A <i>embA</i>		
Haplotipo 34	0	1	0	T76A <i>eis</i> *	P29L <i>gidB</i>			
Haplotipo 35	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	S8A <i>panD</i>	A724V <i>rpoA</i>		
Haplotipo 36	1	0	0	T76A <i>eis</i> *	K213R <i>rpoA</i>			

Nota: En todos los haplotipos se presentan 16 mutaciones no sinónimas presentes en el 100% de los genomas de *M. bovis* en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (H57D *pncA*, A440T *rpsA*, A38V, PPE49, T2070I *embC*, N88S *iniA*, H481Q *iniA*, I322V *Rv1592c*, R463L *katG*, E21Q *gyrA*, S95T *gyrA*, D639A *gyrA*, G668D *gyrA*, A248S *gyrB*, A442 *gyrB*, I603V *bacA*, H309D *ddrA* . * mutaciones que solo se presentaron al comparar los genomas con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. ** mutaciones que solo se presentaron al comparar los genomas con la cepa *M. bovis*. Celda en blanco: no hay mutaciones, celdas sin relleno mutaciones únicas, celdas que comparten el mismo color de relleno, misma mutación.

Haplotipos y perfil de resistencia molecular

En cuanto al análisis de los haplotipos para esta descripción no se consideraran las 16 mutaciones reportadas en el 100% de los genomas que solo se presentaron en comparación con la cepa de referencia *M.tuberculosis H37Rv*. Siendo entonces que el mínimo número de mutaciones por haplotipo fueron dos y el máximo número de mutaciones fueron cinco.

En los genes asociados a resistencia para fármacos de primera línea se presentó monorresistencia molecular en los haplotipos 1, 2, 9 y 15 por mutaciones en genes asociados a resistencia a PZA (*rpsA*, *panD* y *pncA*) los cuales están representados por aislados de ganado lechero (57%), ganado de carne (57%) y humanos (64%). En los haplotipos 3, 16, 35 y 36, además de presentar mutaciones en genes asociados a resistencia a PZA presentaron mutaciones compensatorias (*rpoA* y *rpoC*), representados por aislados de ganado lechero (11.6%), ganado de carne (7.6%) y humanos (23%). Los haplotipos 6, 19-21 representados por ganado lechero (3.8%) presentaron polirresistencia molecular a PZA e INH (*katG*, *ndh*, *rrs* y *embA*). Los haplotipos 5 y 34 presentaron polirresistencia molecular a PZA y STR (*rrs* y *gidB*), los cuales están representados por aislados de ganado lechero (4.6%) y ganado de carne (3.8%). Los haplotipos 10, 17 y 18 presentaron polirresistencia molecular a PZA y ETB (*embA* y *embC*), los cuales están representados por aislados de ganado lechero (3%). El haplotipo 11 presentó polirresistencia molecular a PZA, ETB e INH (*katG*), representado por dos

aislados de ganado de carne. El haplotipo 33, con polirresistencia molecular a PZA, INH (*nat*) y ETB (*embA*), fue representado por un aislado de ganado lechero.

En los genes asociados a resistencia para fármacos de segunda línea, el haplotipo 26 presentó polirresistencia molecular a PZA y FLQ (*gyrB*), representado por un aislado de humano. Los haplotipo 23 y 24 con polirresistencia molecular a PZA, AMIK/HAN (*eis*) representados por un aislado de ganado de carne y uno de leche respectivamente. El haplotipo 25 con polirresistencia molecular a PZA, AMIK/KAN y FLQ (*gyrA*), fue representado por un aislado de ganado de carne. El haplotipo 27, con polirresistencia molecular a PZA, AMIK/KAN y FLQ (*gyrB*), fue representado por un aislado de ganado de leche.

En los genes asociados a resistencia para bombas de eflujo, los haplotipos 7, 29-31, con polirresistencia molecular a PZA y RIF (*emrB* y *mmr*), están representados por ganado lechero (4%). El haplotipo 13, con polirresistencia molecular a PZA y RIF (*Rv3239c*), se representó por un aislado de ganado lechero y uno de humano.

Se presentaron haplotipos con mutaciones en combinación de genes asociados a fármacos de primera línea y segunda línea, el haplotipo 14, con polirresistencia molecular a PZA, ETB (*embC*), y ETO (*ethA*), fue representado por dos aislados de

ganado lechero. El haplotipo 22, con polirresistencia molecular a PZA, INH (*ndh*) y CAP (*thlyA*), fue representado por un aislado de ganado lechero.

Se presentaron haplotipos con mutaciones en combinación de genes asociados a fármacos de primera línea y bombas de eflujo, el haplotipo 12, con polirresistencia molecular PZA, STR (*rrs*) y RIF (*Rv1258c*), se presentaron en dos aislados de ganado de carne.

Se presentaron haplotipos con mutaciones en combinación de genes asociados a fármacos de segunda línea y bombas de eflujo, el haplotipo 8, con polirresistencia molecular a AMI/KAN por mutaciones en *eis* y RIF por mutaciones en *emrB*, se presentó en tres aislados de ganado lechero. El haplotipo 28, con polirresistencia molecular a AMI/KAN (*eis*) y RIF (*Rv3239c*), se presentó en un aislado de ganado lechero.

DISCUSIONES

El 100% de los genomas analizados de *M. bovis* aislados de ganado bovino y humano mostraron la mutación H57D en el gen *pncA* la cual es característica de esta especie, haciéndola naturalmente resistente a PZA (Scorpio 1996). Además de esta mutación, se observaron 15 mutaciones no sinónimas presentes en el 100% de los genomas, solo al ser comparados con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv*. El 50% de las mutaciones están referidas en la literatura, en donde la mutación I322V *Rv1592c*, no se asocia con en la resistencia a la isoniazida (Ramaswamy et al. 2003), la mutación R463L *katG* se reporta como un polimorfismo (Ramaswamy et al. 2003) o una mutación neutral (Ando et al. 2011) la mutación T270I *embA* se ha confirmado mediante métodos experimentales la ausencia de asociación en la resistencia a ETB (Brossier et al. 2015), la mutación A440T *rpsA* no se asocia en la resistencia a PZA (Tan et al. 2014), las mutaciones E21Q *gyrA*, S95T *gyrA*, y G668D *gyrA* se describen como polimorfismos comunes las cuales no se asocian a resistencia para FLQ, y son excluidas de los análisis de farmacorresistencia (Tabla XIII- XV). (Devasia et al., 2012). El restante 50% se reportan por primera vez en este estudio, (A38V *PPE49*, N88S, H481Q, *iniA*, D639A *gyrA*, A248S, A442S *gyrB*, I603V *bacA*, H309D *ddrA*) al estar presentes en el 100% de los genomas pudieran tratarse de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

En comparación de los 172 genomas de *M. bovis* con la cepa *M. bovis* AF2122/97, se observaron 31 mutaciones no sinónimas, 17 mutaciones presentes en diez genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea (Tabla XIII), ocho mutaciones en cinco genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea (Tabla XIV) y seis mutaciones en cuatro genes asociados a bombas de eflujo (XV), la frecuencia de presentación de estas mutaciones fue muy variable, en donde la frecuencia menor fue del 0.58% (un aislado) en donde se observaron siete mutaciones presentes solo en un aislado, la frecuencia mayor fue del 29.6% (51 aislados) observada en la mutación S8A gen *panD* (Tablas XIII-XV). Cabe resaltar que de estas 31 mutaciones solo una la G162S *pncA* ha sido reportada anteriormente en aislados de *M. tuberculosis* en donde se describe que en las pruebas de susceptibilidad a fármacos esta mutación es sensible al fármaco mientras con hybridization-based line probe assay (LiPA) se reportó como resistente (Mitarai et al. 2012) por lo que no es claro si esta mutación le confiere resistencia a PZA a aislados de *M. tuberculosis* (Tabla XIII).

Las 30 mutaciones restantes han sido reportadas por primera vez en este estudio. En las bases de datos Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database, US National Library of Medicine National Institutes of Health, National Center for Biotechnology Information, así como en más de 50 artículos científicos en donde se reportan mutaciones basadas en secuenciación sanger, y secuenciación de genoma completo, no se reportan. Debido a esto se realiza una búsqueda continua en las bases de datos

mencionadas y en las investigaciones de mutaciones en genes asociados a resistencia a fármacos, siendo la última revisión el 12 de julio del 2017.

Es importante resaltar que en los genomas de *M. bovis* analizados (172) no se registraron aislados MDR ya que, no se observaron mutaciones en los genes *rpoB* e *inhA*. Además no se observó la mutación S315 *katG*, la cual es la más frecuente reportada en los aislados de *M. tuberculosis* resistentes a INH (Zhang & Yew 2009). Pudiendo sugerir conforme a las mutaciones no sinónimas reportadas en este estudio habría cepas con monorresistencia y polirresistencia molecular.

En el análisis de los haplotipos se observaron, relación entre las mutaciones observadas con el patrón de espigotipo, además se observaron haplotipos con monorresistencia (PZA) y polirresistencia molecular. Desafortunadamente una limitante en el estudio fue no tener los recursos para realizar las pruebas fenotípicas paralelas de susceptibilidad a fármacos, por lo que esta limitación aumenta la dificultad para evaluar y reportar a las cepas de importancia en los determinantes de la resistencia a los fármacos fuera de las mutaciones registradas en los genes que fueron evaluados, por lo que no es posible concluir el perfil de resistencia o drogosensibilidad de los aislados debido a que las mutaciones encontradas no están registradas previamente.

CONCLUSIONES GENERALES

Se identificó la co-circulación de *M. bovis* y *M. tuberculosis* en ganado bovino en Baja California. Esto representa un reto para el control de la TBB, por lo que es necesario reforzar las medidas de control destinadas a prevenir la propagación, incluyendo la correcta aplicación de los sistemas de vigilancia en el ganado.

Se identificaron 12 patrones de espoligotipos *in silico* utilizando análisis bioinformático con el programa *SpoTyping-v2.0-commandLine*. En humanos se observaron tres patrones de espoligotipo, los cuales fueron idénticos a los espoligotipos identificados en ganado bovino, lo cual indica que existe relación genética entre los aislados de *M. bovis* de humanos y de ganado. El análisis de SNPs corroboró esta información.

El análisis de SNPs indica que los aislados de *M. bovis* provenientes de humanos se originan de ganado bovino de la región. Sin embargo, en los humanos de este estudio, la vía de transmisión fue aérea, ya que todos los pacientes presentaron tuberculosis pulmonar y además declararon que no tenían contacto directo o indirecto con ganado bovino.

En este estudio se reportan 39 mutaciones no sinónimas en 24 genes relacionados a farmacorresistencia (31 mutaciones de 19 genes de primera línea y 8 mutaciones de 5 genes de segunda línea) y 10 mutaciones de 7 genes de bombas eflujo . Sin embargo, todas estas mutaciones no se han reportado anteriormente en la literatura o en la base de datos TB drug resistance mutation database (<https://tbdreamdb.ki.se/Info/>), con excepción de la G162S en el gen *pncA* que está relacionado con resistencia a pirazinamida.

RECOMENDACIONES

En México desde a partir de la década de los noventas, se han implementado programas de prevención, control y erradicación de la tuberculosis en humanos (NOM-006-SSA2-1993) como de en ganado bovino (NOM-031-ZOO-1995), sin embargo, la prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado con el tiempo y en una gran parte del territorio mexicano. Por tal motivo, es imperativo que se revisen los procesos tanto administrativos como técnicos que se realizan en la vigilancia de esta enfermedad tanto en población humana como en ganado bovino.

Debido a que se identificó la co-circulación de *M. bovis* y *M. tuberculosis* en ganado bovino, y en humanos se identificó a *M. bovis*, es necesario que se implemente la búsqueda y la identificación molecular de estas dos especies tanto en humanos como en ganado bovino con sospecha de tuberculosis. También es recomendable que se realice la identificación de genotipos utilizando herramientas moleculares como MIRUs, espoligotipos o bien SNPs con base en Secuenciación de Genoma Completa. Con estos resultados se puede determinar la dinámica de la transmisión de estas especies, así como para la identificación oportuna de brotes de infección.

Reforzar las medidas de seguridad e higiene en el manejo del ganado durante todo el proceso zootécnico, con el objetivo de minimizar la transmisión de TBB en hatos y engordas. Implementar campañas de vacunación como una estrategia para reducir la

incidencia de TBB, ya que al igual que en la población humana esto reduciría la infección y la transmisión entre bovinos así como entre bovinos-humanos.

La TBB no es sólo una enfermedad que resulta en un régimen frustrante de pruebas, eliminación de reactores y restricciones de movimiento, sino que también un factor importante son las pérdidas económicas que esta ocasiona a la industria ganadera y a los fondos públicos. Para reequilibrar el costo de la enfermedad entre los sectores público y privado, es necesario un cambio de cultura, actitud y compromiso compartido el control de la TBB, basados en el conocimiento de que son mayores las pérdidas económicas que se generarían por el decomiso de los animales enfermos, que llevar a cabo las estrategias establecidas para la erradicación de la enfermedad. Por último, identificar o crear acuerdos sostenibles que permitan al gobierno un mejor despliegue de recursos.

ANEXO 1

Tabla XX. Mutaciones sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*

Fármaco	Gen	Mutaciones sinónimas	% Bovinos lecheros (129)	% Bovinos de Carne (26)	% Humanos (17)	Reportada
<i>STR</i>	<i>gidB</i>	A205A*	100	100	100	Si (Regmi etal.,2015)
<i>RIF</i>	<i>rpoB</i>	D903D	0.78	-	-	No
		A1075A*	100	100	100	No
<i>ETB</i>	<i>Rv0340</i>	G64G	3.1	-	-	No
	<i>PPE49</i>	A265A	3.1	-	-	No
	<i>embA</i>	T329T*	100	100	100	No
	<i>embB</i>	V117V*	100	100	100	No
		A338A*	100	100	100	No
	<i>embC</i>	L538L	-	3.8	-	No
		R927R	100	100	100	No
T1036T		100	100	100	No	
<i>INH</i>	<i>iniA</i>	E212E	1.5	-	-	No
	<i>Rv1592c</i>	P20P	3.1	-	-	No
	<i>katG</i>	P29P*	100	100	100	No
		T203T*	100	100	100	No
		R78R	0.78	-	-	No

	<i>srmR</i>	V112V*	100	100	100	No
	<i>fabD</i>	A219A	0.78	-	-	No
	<i>kasA</i>	A349A	0.78	-	5.8	No
	<i>accD6</i>	D200D*	100	100	100	Si (Regmi et al., 2015)

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*

Tabla XXI. Mutaciones sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea indicando en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF212297*

Gen	Fármaco	Mutaciones sinónimas	%Bovinos lecheros (129)	% Bovinos de Carne (26)	%Humanos (17)	Reportada
<i>FLQ</i>	<i>tlyA</i>	L11L*	100	100	100	No
	<i>gyrA</i>	I614I*	100	100	100	No
	<i>gyrB</i>	V210V*	100	100	100	No

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*

Tabla XXII. Mutaciones sinónimas y frecuencia en genes asociados a bombas de eflujo en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF212297*

Eflujo de fármaco	Regulado diferencialmente por los fármacos indicados	Gen	Mutaciones sinónimas	% Bovinos lecheros (129)	% Bovinos de Carne (26)	% Humanos (17)	Reportada
	INH, RIF, OFL	<i>Rv1410c</i>	G436G	0.78	-	-	No
INH		<i>Rv1747</i>	S777S*	100	100	100	No
			H106H	0.78	-	-	No
		<i>bacA</i>	Y513Y	-	3.8	-	No
		<i>ddrA</i>	H309D	100	100	100	No
RIF	RIF	<i>Rv3239c</i>	L874L*	100	100	100	No
			Y553Y*	98.5	92.3	94.1	No
RIF		<i>emrB</i>	G240G*	100	100	100	No
		<i>ddrA</i>	H309D*	100	100	100	No

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*

Tabla VII. Frecuencias de espoligotipos de *Mycobacterium bovis* en casos de ganado y humanos reportados en esta investigación. Distribución en México y el mundo de todos los espoligotipos en este estudio (n=172 aislados) comparado con la base de datos www.mbovis.org y otros reportes.

Espoligotipo	Número (%) aislado			Distribución en B.C		Distribución en México	Distribución Mundial
	Ganado	Humano	Total	Aislaos de humano (%)	Aislados de ganado (%)		
SB0145	92 (59)	11 (65)	103 (59)	Tijuana 8 (73), Tecate 1 (9), Ensenada 1 (9), Rosarito 1(9)	Ensenada 45 (51), Tijuana 29 (32), Mexicali 14 (17)	Ags, B.C, EDM, Gto, Hgo, Jal, Nay, Qro, Sin, Ver,	ARG, AUS, BRA, FRA, GBR, IRL, MEX, USA,
SB1040	47 (30)	5 (30)	52 (30)	Tijuana 4 (80), Tecate 1 (20)	Ensenada 27 (58), Tijuana 13(26), Mexicali 6 (14), Tecate 1 (2)	Ags, B.C, EDM,	ARG, BRA, CRI, KOR, PRY, URY
SB0162	3 (2)		3 (1.75)		Tijuana 3 (100)		BEL
SB1345	3 (2)		3 (1.75)		Ensenada 3 (100)		ESP, MEX, USA
SB0971	1 (0.6)	1 (5)	2 (1.2)	Tijuana 1 (100)	Tijuana 1 (100)	Ags, B.C, Chia, EDM, Gto, Hgo, Jal, Mich, Mor, Nay, Oax, Qro, SLP, Son, Ver	ESP, MEX, USA
SB0327	2 (1.3)		2 (1.2)		Mexicali 2 (100)	Ags, Coah, EDM, Hgo	MEX, ARG, NLD
SB1758	2 (1.3)		2 (1.2)		Ensenada 1 (50) Tijuana 1 (50)		USA
SB1760	1 (0.6)		1 (0.6)		Tijuana 1(100)		USA
SB0140	1 (0.6)		1 (0.6)		Mexicali 1(100)	Ags, Coah, EDM, Gto, Hgo, Jal, Mich, Mor, Qro, Zac,	ARG, AUS, CHL, ESP, GBR, IRL, USA
SB0986	1 (0.6)		1 (0.6)		Mexicali 1 (100)		MEX.
SB2468*	1 (0.6)		1 (0.6)		Ensenada 1 (100)	Baja California	MEX
SB2469*	1 (0.6)		1 (0.6)		Ensenada1 (100)	Baja California	MEX
Total	155 (100)	17 (100)	173 (100)				

Distribución en México: Ags: Aguascalientes, B.C.: Baja California, Chia: Chiapas, Coah: Coahuila, EDM: Estado de México, Gto: Guanajuato, Hgo: Hidalgo, Jal: Jalisco, Mich: Michoacán, Mor: Morelos, Nay: Nayarit, Oax: Oaxaca, Qro: Querétaro, S.L.P: San Luis Potosí, Sin: Sinaloa, Son: Sonora, Ver: Veracruz, Zac: Zacatecas. Distribución mundial: ARG: Argentina, AUS: Australia, BEL: Belgium, BRA: Brazil, CHL: Chile, CRI: Costa Rica, ESP: Spain, FRA: France, GBR: United Kingdom, IRL: Ireland, KOR: South Korea, MEX: México, NLD: Holland, PRY: Paraguay, URY: Uruguay, USA: United States of América. (Rodwell et al. 2010; Milián-Suazo et al. 2012; Smith & Upton 2012; Vazquez-Chacon et al. 2015), Celda en blanco: No hay datos. *Nuevos patrones de espologotipos

Tabla VIII. Expoligotipos de *Mycobacterium bovis* en ganado de México.

Lugar de aislamiento	Años de detección	Aislados (%)	Expoligotipo (%)	VNTR
Qro. (Milián et al. 2000)	1992-1996	81 (79)		
Ags, Qro, Hgo, Coah. (Milian-Suazo et al. 2000)	1996-1997	308 (77)		
Ags, Qro, EDM, Jal. (Milián-Suazo et al. 2002)	1996-1997		Huerfanos (12), SB0663 (7), SB 1014 (7), SB0269, SB1109, SB1208, SB1493 (7), SB1697, SB1699, SB1700, SB1701, (7) SB1702, SB1704, SB1705, SB1706 (7) SB1707, SB1709, SB1710, SB1711 (7), SB1714, SB1715, SB1717, SB1718 (7), SB1719, SB1720, SB1721, SB1722 (7), SB1733, SB1114 (5), SB0669 (3), SB1110 (3), SB1111 (3), SB116 (3), SB1119 (3), SB1735 (3).	
Cd Juárez (Cobos-Marín et al. 2005)	2000	58 (58)	SB0121 (50), SB0140 (14), SB0673 (9), SB098 (7), SB0987, SB0272, SB0327, SB0807, SB0985 (20).	
Ver, Jal, EDM. (Santillan-Flores et al. 2006)	1993-1998		SB0269 (12), SB0669 (12), SB0663 (10), SB1118 (7), SB1114 (7), SB1119, SB1120, SB1121 (7), SB1122, SB1123, SB1124 (7), SB1126, SB1127, SB1128 (7), SB1129, SB1130, SB1131 (7), SB1132, SB1133, SB1134 (7), SB0130, SB0140, SB0145 (7), SB1113 (5), SB1125 (4.5), SB0971 (5).- SB0673 (23.8), SB0121 (9.7), SB0140 (6.9), SB0669 (6.3), SB0145 (6), SB0971 (3.6), SB0296 (2.8), SB0327 (2.8), SB1165, SB0986, SB0663, SB1040 , SB1116, SB 119 (9.2), SB1044, SB1496, SB0272, SB0130, SB111, SB114, SB0987, SB1118, SB1216 (6.2), SB1110, SB1696, SB1125, SB1113, SB1129, SB1503, SB0807, SB1757SB1755, SB0452 (3.8), SB0152 (0.2) SS (18.5).	
13 de 32 estados (Rodwell et al. 2010)	1997-2007			
B.C. (Martínez-Vidal et al. 2011)	2008-2010	21 (43)		8 loci
B.C. (Bermúdez et al. 2012)	2006-2007	166 (62)		
19 de 32 estados (Gutiérrez Reyes et al. 2012)	2009-2010		Huerfanos (17), SB0673 (15), SB0669 (12), SS (11), SB0145 (7), SB0971 (7), SB0140 (6), SB0121 (6), SB0663 (4), SB0269 (4), SB116 (3), SB0119 (2), SB0327 (1), SB2055 (1), SB0484 (1), SB1165 (1),	
17 de 32 estados (Zumárraga et al. 2013)	Nd		Huerfanos (24), Others (26), SB0121 (11), SB0673 (8), SB0140 (5), SB0269 (4), SB0663 (4), SB1112 (4), SB0971 (4), SB1165 (2), SB1116 (2), SB0669 (2), SB0145 (2), SB0327 (2).	

Chia, Tab, Ver (Vazquez-Chacon et al. 2015)	2011-2012		SB0673 (28), SB0971 (19), SB0140 (15), SB0145 (8.5), SB1388 (6), Orphan (4.2), SB2374 (4.2), SB0121 (2), SB0120 (2), SB0268 (2), SB0130 (2), SB0662 (2), SB0327 (2), SB0669 (2).	24 loci
26 de 32 estados (Milian-Suazo et al. 2016)	2003-2010		SB0673 (11.8), SB0669 (9.3), SB0121 (6), SB0145 (5.8), SB0971 (5.3), SB0140 (5), SB0663 (4), SB0269 (3.3), SB1116 (3.2), SB0120 (2.2), SB119 (2), SB1165 (1), Otros (41.)	
16 de 32 estados	2009-2010			12 loci
B.C. Este estudio	2014-2015	155 (82)	SB0145 (58), SB1040 (31), SB0162 (2), SB1345 (2), SB0327 (1.3), SB1758 (1.3), SB2468* (0.6), SB2469* (0.6) SB0971 (0.6), SB1760 (0.6), SB0140 (0.6), SB0986 (0.6).	

Lugar de aislamiento: Ags: Aguascalientes, B.C: Baja California, Chi: Chiapas, Coah: Coahuila, EDM: Estado de México Hgo: Hidalgo, Jal: Jalisco, Qro, Querétaro, Tab: Tabasco, Ver: Veracruz. Nd: no hay datos SS: un espoligotipo, Negritas: Coinciden con espoligotipos de humanos, celda en blanco: no hay datos. *Nuevos patrones de espoligotipos.

Tabla IX. *Mycobacterium bovis* en casos de humanos, reportados en México

Lugar de aislamiento	Años de detección	Aislados <i>M. bovis</i> (%)	Espoligotipo (%)	VNTR	Resistencia a fármacos
Qro. (Pérez-Guerrero et al. 2008)	2006-2007	15 (16)	Huérfano* (53.3), SB0140 (13.3), SB0663 (6.6), SB184 (6.6), SB119 (6.6), SB1852 (6.6), SB1828 (6.6)		
CDMX (Cicero et al. 2009)	2000-2003	17 (10.4)	Huérfano* (53), SB0268 (12), SB0120 (6), SB0849 (6), SB0961 (6), SB0897 (6), SB0850 (6), SB0669 (6)		
Qro. (Milián-Suazo et al. 2010)	2006-2007	34 (17)	Orphan* (21), SB1824-1828 (15), SB1849-1852 (12), SB1833, SB1834, SB1836, SB1837 (12), SB0663, SB0971, SB0119, SB0856 (12), SB18461 (8), SB1839-1841 (8), SB0140S (6), SB1830, SB1831 (6),		
Gdl. (Portillo-Gómez & Sosa-Iglesias 2011)	1995-2009	35 (28)			
CDMX (Cortés-Torres et al. 2013)	2007-2008	10 (10)	SB0120 (40) Huérfano* (30), SB0288 (20), SB0267 (10)		
S.LP. (López-Rocha et al. 2013)	2006-2010	5 (2.1)	Huérfano (20), SB215 (20), SB0669 (20), SB0812 (20), SB1484 (20)		
Hgo. (Torres-Gonzalez et al. 2013)	2009-2011	2 (6.6)	Orphan (50), SB0121 (50)		
17 de 32 estados (Zumárraga et al. 2013)			Other (23), SB1818, SB1824, SB1825, SB1826, SB1827, SB1828 (19), SB1829, SB1830, SB1831, SB1833, SB1834, SB1836 (19), SB1837, SB1838, SB1839, SB1840, SB1841, SB1849 (19), SB1850, SB1851, SB1852 (9), SB1846 (9)		
B.C. (Laniado-Laborín et al. 2014)	2011-2013	27 (4.35)		8 loci	3.7% Z + H + E 3.7% Z + E 3.7% Z + R
CDMX, Chi, EDM, Yuca (Vazquez-Chacon et al. 2015)	2008-2009	6 (0.3)	SB0145 (16.6), SB0120 (16.6), SB0268 (16.6), SB0669 (16.6), Huérfano (16.6), SB2218 (16.6)	24 loci	0.15% MDR

All Mexico (Bobadilla-del Valle et al. 2015)	2000- 2014	309 (26)		10.9% S 7.6% MDR
6 de 32 estados (Milian-Suazo et al. 2016)	2003- 2010	Nd	SB0140 (30), SB0673 (12), SB0669 (12), SB0145 (12), SB0121 (6), SB0971 (6), SB0663 (6), SB0120 (6), SB119 (6)	
B.C. Este estudio	2011- 2013	17 (63)	SB0145 (65), SB1040 (30), SB0971 (5)	

-
- 2 Lugar de aislamiento: B.C: Baja California, Chi: Chihuahua CDMX: México City, EDM: Estado de México, Gdl:
 - 3 Guadalajara, Hgo: Hidalgo, Qro: Querétaro, Yuc: Yucatán. *: Representa diferentes espoligotipos, Z: pirazinamida, H
 - 4 isoniazida, E: etambutol, R: rifampicina, S: streptomycin, MDR: multidrogoresistencia. Negritas: coinciden con espoligotipos
 - 5 de ganado. Celda en blanco: No hay datos.

Capítulo III

Farmacorresistencia molecular en cepas de *M. bovis* en aislados
microbiológicos de humanos y de ganado bovino en Baja
California, México

Introducción

Especies dentro del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* (CMT) son naturalmente resistentes a gran variedad de antibióticos, esto dificulta el tratamiento contra la TB (Zhang & Yew 2015). Uno de los mecanismos de resistencia del CMT a los antibióticos se debe a la pared celular de los bacilos; por ser hidrofóbica actúa como una barrera de permeabilidad. Por otro lado, mucho del potencial de resistencia del CMT está codificado en su genoma (Fenner et al. 2012). Esto incluye genes que codifican para enzimas hidrolíticas y para enzimas modificadoras de fármacos, como las beta-lactamasas y las aminoglicósido-acetil-transferasas. Además de diversas proteínas transportadoras de eflujo (*efflux*), pertenecientes a la súper familia mayor facilitadora (*Major Facilitator Superfamily*), y numerosos transportadores tipo ABC (*Adenosine Triphosphate Binding Cassetes*) (Black et al. 2014; Du et al. 2014). Por otro lado, se conocen diversas mutaciones que confieren resistencia a especies dentro del CMT contra los medicamentos de primera y segunda líneas, utilizados para el tratamiento de TB. Uno de cada 1×10^6 - 1×10^8 bacilos de *M.tuberculosis* (dependiendo del fármaco)(Zhang & Yew 2009) muta espontáneamente en su genoma, y resistente a la acción de fármacos contra la TB de primera línea (Zhang & Yew 2015). Estas bacterias están distribuidas en todo el mundo. Generalmente, el surgimiento de cepas resistentes a fármacos es el resultado de un tratamiento inadecuado

Los medicamentos contra la tuberculosis de primera línea son estreptomycin (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA).

Los más eficaces son INH y RIF. Los fármacos de segunda línea son menos eficaces, más tóxicos o tienen ambas características, y sólo se recurre a ellos en casos extremos, cuando se detecta resistencia a INH y RIF. Generalmente la resistencia a RIF está asociada a otros dos o tres fármacos de primera línea (Becerril-Montes et al. 2013a). Los fármacos de segunda línea más utilizados son Kanamicina, (KM) Amikacina (AMK), Capreomicina (CPM), Etionamida (ETO), Cicloserina (CS), además de varias Fluorquinolonas (FM), entre ellas Ofloxacina (OFX) y Ciprofloxacina (CIP) (Becerril-Montes et al. 2013b).

La TB multidrogorresistente, (TB-MDR) se define como aquellas cepas que son resistentes por lo menos a dos fármacos antituberculosos de primera línea la RIF e INH. Mientras que la TB extremadamente drogorresistente (TB-XDR) se define como aquella que es resistente a una FQ y por lo menos a uno de los tres antibióticos inyectables de segunda línea AMK, CAP o KAN (Secretaria de Salud México 2015).

Los datos con respecto a sensibilidad a los medicamentos para *M. bovis* en los seres humanos y los animales son limitados. Sin embargo en un reporte en México en donde se compararon los perfiles de resistencia de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, se observó una mayor proporción de MDR primaria considerablemente mayor en *M. tuberculosis* y una mayor monorresistencia STR entre los aislados de *M. bovis* (Bobadilla-del Valle et al. 2015). En San Diego se informó que de 167 casos de TB por *M. bovis* el 7% resultó resiste a INH y el 1% a RIF (LoBue & Moser 2005). En un

informe de TB del Servicio Nacional de genotipado de los Estados Unidos informó que de 165 aislados de *M. bovis* el 17% resulto resistente a STR (Rivero et al. 2001).

Se cree que la alta proporción de resistencia primaria a STR entre los aislados de *M. bovis*, puede explicarse por el uso de aminoglucósidos para el tratamiento de otras enfermedades en el ganado bovino. (Economou & Gousia 2015). Algunos autores han sugerido que la resistencia primaria a INH y RIF en *M. bovis* puede indicar transmisión de humano a humano (Hlavsa et al. 2008). Recientemente en México se describió la caracterización molecular de tres cepas de *M. bovis* identificadas en humanos MDR (Vazquez-Chacon et al. 2015).

Mycobacterium bovis es conocido por ser naturalmente resistente a la PZA. La presencia de una mutación puntual C-G en el gen *pncA*, en el nucleótido 169, le confiere resistencia natural a la PZA a *M. bovis* (Zhang & Mitchison 2003).

Objetivo General

Determinar el perfil de farmacorresistencia de los aislados de *M.bovis* provenientes de humanos de ganado bovino en Baja California

Objetivos específicos

1.- Caracterizar mutaciones en genes relacionados con resistencia a fármacos de primera y segunda línea así como en bombas de eflujo relacionados en aislados de *M. bovis*.

2.- Determinar la farmacorresistencia y la drogosensibilidad de aislados de *M. bovis* mediante la Identificación de mutaciones en genes asociados a, fármacos de primera, segunda línea y bombas de eflujo.

Mecanismos moleculares generadores de farmacorresistencia a fármacos de primera línea.

Pirazinamida (PZA)

Fármaco antituberculoso de primera elección, básico en el tratamiento contra la TB. El empleo de este fármaco se inició en el año de 1952, el cual funciona específicamente contra bacilos semilantes que no son afectados por ningún otro medicamento antituberculoso. Una de sus principales ventajas es que disminuye el tiempo de tratamiento, debido a su sinergia con INH y RIF. Respecto a su mecanismo de acción, la PZA es transformada por la enzima pirazinamidasa a su principio activo, ácido pirazinoico (POA), el cual genera un pH ácido intrabacteriano, al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis* (Zhang & Mitchison 2003). La pirazinamidasa es codificada por el gen *pncA*, mutaciones en este gen explican el 80% de las cepas resistentes a este fármaco (Quirós-Roldán et al. 2001). Sin embargo, su principal desventaja radica en su alta especificidad en contra de *M. tuberculosis*, de manera que si la cepa infectante es diferente, como *M. bovis*, el tratamiento no es efectivo (Said Fernández et al. 2005). Como se mencionó anteriormente para el caso particular de *M. bovis*, en el codón 57 del gen *pncA*, se ha identificado una mutación puntual (C→G) que resulta en la sustitución de His por Asp.

Recientemente se ha demostrado que mutaciones en los genes *rpsA* y *panD*, se encuentran en algunas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA las cuales carecen de mutaciones en el gen *pncA*. El gen *rpsA* codifica la proteína ribosomal S1

(RpsA), proteína vital involucrada en la traducción de proteínas y el proceso de preservación del ribosoma (Shi et al. 2011). Sin embargo hasta el momento no se han reportado cepas de *M. bovis* resistentes a PZA por mutaciones en este gen (Feuerriegel et al. 2013). El gen *panD* codifica la enzima aspartato descarboxilasa, implicada en la síntesis de B-alanina, es un precursor de la biosíntesis de pantotenato y de co-enzima A (Shuo Zhang et al., 2013).

Rifampicina (RIF)

Fármaco importante con fuerte actividad bactericida, ha sido empleado desde 1970 (Quirós-Roldán et al. 2001), su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes (Said Fernández et al. 2005).

Esta se une a la subunidad β del complejo enzimático que conforma la ARN polimerasa dependiente de ADN, e inhibe la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm). Los transcritos de ARNm son esenciales para la síntesis de proteínas (traducción) (Kocagoz et al. 2005). La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: α , β , β' y σ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la RNA polimerasa, disminuyendo la afinidad por RIF y otorgando resistencia al fármaco (Said Fernández et al. 2005). Recientemente fueron identificadas mutaciones compensatorias en los genes *rpoA* y *rpoC* que restauran la aptitud de las bacterias resistentes a RIF que portan mutaciones en *rpoB* (M. de Vos et al. 2013)

En cepas de *M. bovis* resistentes a este fármaco se han identificado en el gen *rpoB* tres mutaciones de sustitución de nucleótidos en los codones 513, 521, y 526, designados como Q513K, L521P, y H526Y, se ha demostrado que el 60% de las cepas que presentan mutaciones en este gen es la posición del codón 521, el cual resulta en el cambio de leucina a prolina. Esto sugiere que el codón 521 puede ser importante para el desarrollo de resistencia RIF en *M. bovis* (Sechi et al. 2001).

Isoniacida (INH)

Es un fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la tuberculosis desde 1952 (Quirós-Roldán et al. 2001), actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de multiplicación activa (Said Fernández et al. 2005). La INH, interfiere con la biosíntesis de pared celular en MTB. Es un pro-fármaco que es convertido a su forma activa por la catalasa-peroxidasa (codificada por el gen *katG* de la micobacteria), activada inhibe la acción de la proteína acarreadora enoil-acil reductasa (*inhA*). *InhA* es un importante enzima, componente del complejo de la sintetasa de ácidos grasos (FAS-II). FAS-II está involucrada en la síntesis de ácidos micólicos de cadena larga. Los ácidos micólicos son componentes estructurales esenciales de la pared celular de las micobacterias, y están unidos a la capa de arabinogalactano (Quirós-Roldán et al. 2001; Said Fernández et al. 2005). La resistencia a INH se asocia en *M. tuberculosis* con una variedad de mutaciones que afecta principalmente a los genes *katG* e *inhA*, sin embargo se han detectado mutaciones con menor frecuencia en *kasA*, *oxyR* y *ahpC*, *ndh*, *nat*, *mshA*, (Jagielski et al. 2014). El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de la cepas de *M.*

tuberculosis resistentes a isoniacida (Caws & Drobniowski 2001; Quirós-Roldán et al. 2001), siendo la mutación más frecuente S315 *katG*, la cual por lo general no eliminan completamente la actividad de la catalasa, y en tales cepas no disminuye su desempeño y virulencia, lo que puede explicar su frecuente ocurrencia entre aislados clínicos (Zhang & Yew 2009). Las mutaciones en la región intergénica *furA-katG* región promotora que afecta la expresión de *katG* se encuentra ocasionalmente en algunas cepas con resistencia a INH. Por lo general las mutaciones en *katG*, causan resistencia de alto nivel (Ando et al. 2011; Siu et al. 2014). En cepas de *M.bovis* resistentes a INH se han reportado las siguientes mutaciones en este gen, en el codón 463 CTG3CGG (L463R), en el codón 315 AGC3ACC (S315T), y en el codón 506 GAG3AAG (E506K) (Sechi et al. 2001). Mutaciones que afectan al gen *inhA* son la segunda causa de resistencia a isoniacida, también puede ocurrir debido a mutaciones en la región promotora de *mabA (fabG1) / inhA*, la cual resulta con la sobreexpresión del gen *InhA* (García-Ramos et al. 2003), el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos (Caws & Drobniowski 2001; Quirós-Roldán et al. 2001). Las mutaciones en *inhA* y en su región promotora se asocian generalmente a un bajo nivel de resistencia, sin embargo las mutaciones en este gen no solamente causa resistencia a INH, también confieren resistencia cruzada al fármaco Etionamida (ETH) por estar relacionado estructuralmente con INH (Banerjee et al. 1994).

Etambutol (E)

Fármaco empleado en contra de TB, utilizado por primera vez en 1961, tiene actividad bacteriostática, y sólo actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa (Quirós-Roldán et al. 2001). Se recomienda para tratar infecciones diseminadas con bacterias pertenecientes al complejo *M. avium*, especialmente en personas infectadas con VIH, que cursan con Diabetes Mellitus, o con antecedentes de abandono o recaída. La probabilidad de resistencia es menor que con otros fármacos, por lo cual se incluye en el tratamiento primario en países con una tasa elevada de resistencia primaria a otro fármaco de primera línea (OMS, 2010). Este compuesto inhibe la acción de la arabinosil transferasa (codificada por *embA*, *B* y *C* de MTB). EmbB es una enzima asociada a membranas, involucrada en la síntesis de arabinogalactano. El arabinogalactano es un componente estructural esencial en la pared de las micobacterias (Telenti et al. 1997). La resistencia a etambutol está asociada a mutaciones en tres genes: *embA*, *embB*, y *embC*, localizados en un locus de 10,000pb (*embABC*), que codifican para la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular. Cerca del 70% de las cepas resistentes a etambutol presentan una mutación puntual en el codón 306 Met del gen *embB*, causando la sustitución por Val, Leu o Ile (Sreevatsan et al. 1997a). Otras mutaciones reportadas se encuentran en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1000 y 1024 (UniProtKB/Swiss-Prot).

Estreptomicina (STR)

Primer fármaco con actividad antituberculosa probada, el cual se descubrió en 1943, actúa en la micobacteria cuando esta se encuentra en el espacio extracelular

(Quirós-Roldán et al. 2001). La estreptomina es un aminoglucósido que interfiere con la traducción del ARNm en *M.tuberculosis*.

La estreptomina se une a la proteína ribosomal S12, que es un componente de la subunidad 30S del complejo ribosomal, por lo que la estreptomina inhibe la síntesis de proteínas micobacterianas. La resistencia a este fármaco se asocia con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs*, los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12S y el ARNr 16S. El gen *rpsL* presenta mutaciones con mayor frecuencia, encontradas en los codones 43 (Lys→Arg y/o Thr) y 88 (Lys→Gln, Arg y/o Thr) (Caws & Drobniowski 2001; Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas 2010). Al igual que ocurre con otros fármacos, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia a estreptomina, en este caso probablemente relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana, ya que el 30% de las cepas resistentes no muestran mutaciones en los genes *rrs* o *rpsL* (Quirós-Roldán et al. 2001).

Se ha reportado que una mutación en el gen *gidB*, que codifica 7-metilguanosina (m (7) G) específico para metiltransferasa 16S rRNA, causa resistencia a SM en bajos niveles en el 33% de aislados de *M. tuberculosis* resistente (Okamoto et al. 2007). En un estudio posterior demostraron que otras mutaciones en *gidB* parecen estar implicados en la resistencia a SM en bajos niveles (Spies et al. 2008).

Mecanismos moleculares generadores de farmacorresistencia a fármacos de segunda línea.

Kanamicina (KM), Amikacina (AMK) y Capreomicina (CPM)

Kanamicina (KM) y su derivado Amikacina (AMK) son inhibidores de la síntesis de proteínas a través de la modificación de las estructuras ribosomal 16S en el rRNA. Las mutaciones en el rRNA 16S (*rrs*) en la posición 1400 se asocia con resistencia de alto nivel a la KM y AMK (Alangaden et al. 1998; Suzuki et al. 1998).

CPM es un antibiótico polipéptido, se ha reportado que mutaciones en el gen *tlyA* el cual codifica rRNA metiltransferasa está involucrado en la resistencia a CPM (Alangaden et al. 1998; Suzuki et al. 1998).

La metiltransferasa rRNA modifica los nucleótidos en la posición c1409 en la hélice 44 de 16S rRNA y c1920 en la hélice 69 de 23S rRNA (Johansen et al. 2006). Se puede observar una variable resistencia cruzada entre KM, AMK, CPM o viomicina (VM). Las cepas resistentes a CPM, KM y VM podrían tener mutaciones en el gen *tlyA*, posición C1402T, o G1484T en el gen *rrs*, mientras que las resistentes a la CPM pero no VM podría tener una mutación en A1401G, esta mutación podría causar resistencia a KM y CPM pero no VM (Georghiou et al. 2012) Pueden ocurrir múltiples mutaciones en el gen *rrs* en una cepa, lo cual le confiere resistencia cruzada entre estos fármacos (Georghiou et al. 2012). Las cepas resistentes a SM por lo general todavía susceptibles a la KM y AMK.

Fluorquinolonas (FQ)

Las ADN topoisomerasas son un conjunto de diversas enzimas esenciales, las cuales son responsables del mantenimiento topológico apropiado de los cromosomas. Las topoisomerasas regulan el súper enrollamiento del ADN y la separación de las cadenas de ácidos nucleicos enredados en la replicación y transcripción (Drlica & Malik 2003).

El mecanismo de acción de las FQs en las especies bacterianas es inhibir a la ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV, lo que resulta en la muerte microbiana. La ADN girasa es una proteína tetramérica A₂B₂. La subunidad A lleva el sitio activo de la rotura-reunión, mientras que la subunidad B promueve la hidrólisis de adenosin trifosfato ATP. *M. tuberculosis* tiene *gyrA* y *gyrB* que codifican para la subunidad A y B (Takiff et al. 1994). Una región conservada, la región determinante de quinolona-resistencia o QRDR por sus siglas en inglés quinolone-resistance-determining región, se ha encontrado que es una de las áreas más importantes involucradas en la resistencia a FQ en *M. tuberculosis* en *gyrA* (320 pb) y *gyrB* (375 pb), (Takiff et al. 1994). Las mutaciones dentro de la región QRDR en el gen *gyrA* se han identificado en aislados clínicos y de laboratorio de *M. tuberculosis*, agrupadas en los codones 74, 83, 87, 90, 91, 94 (Cheng et al. 2004; Pitaksajakul et al. 2005), con Asp94 relativamente frecuente (Cheng et al. 2004; Pitaksajakul et al. 2005) La mutación en el codón 95 se considera un polimorfismo que no participan en la resistencia a quinolonas (Sreevatsan et al. 1997b). Para los aislados clínicos, es más raro que ocurran las mutaciones en *gyrB*. (Lee et al. 2002b;

Pitaksajakul et al. 2005), en general, dos mutaciones en *gyrA* o una mutación concomitante en *gyrA* y en *gyrB* se requieren para el desarrollo de niveles altos de resistencia. (Takiff et al. 1994; Kocagöz et al. 1996). También se ha demostrado que la frecuencia de mutaciones que confieren resistencia FQ en *M. tuberculosis*, y la distribución de los alelos de resistencia posiblemente depende de la concentración del fármaco (Devasia et al. 2012).

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana encargadas del transporte de distintos compuestos desde el interior de las bacterias al exterior, tienen una gran importancia en la resistencia de fármacos antituberculosos, y se clasifican en cinco familias importantes (De Rossi et al. 2006).

ATP-Binding Cassette Superfamily (ABC): Esta familia de transportadores se encuentra presentes en todos los organismos vivos, y conduce sustratos como azúcares, aminoácidos, iones, fármacos, polisacáridos o proteínas gracias a la hidrólisis del ATP (Balganesh et al. 2012). Se ha reportado que en *M. tuberculosis* los transportadores *Rv2686c*, *Rv2688c*, *Rv1747*, *ddrA* y *pstbB* contribuyen a la resistencia frente a antibióticos (Braibant et al. 2000; Choudhuri et al. 2002; De Rossi et al. 2002; Pang et al. 2013)

Small Multidrug Resistance family (SMR): Se trata de una familia de proteínas pequeñas de aproximadamente 110 residuos. Generalmente, forman tetrameros en la membrana citoplasmática y transportan un número muy reducido de sustratos, los cuales son impulsados gracias a un gradiente de protones (Balganesh et al. 2012). El gen *mmr* codifica para una proteína de eflujo de membrana la cual se relaciona con la resistencia a fármacos (De Rossi et al. 2006; Balganesh et al. 2012; Dinesh et al. 2013).

Major Facilitator Superfamily (MFS): Es una de las familias más grandes de transportadores de membrana que se conocen, constituida por 74 familias. Todos los MFS transportadores implicados en el eflujo de antibióticos se piensa que funcionan como antitransportadores monoméricos impulsados por un gradiente de H⁺. De esta familia se ha descrito que el gen *Rv1258c* contribuye con la resistencia a INH, RIF, y EMB, el gen *efpA*, favorece el eflujo de INH, *emrB* y *Rv3239c* al eflujo de RIF, *Rv1410c* y *Rv3728* contribuyen a la resistencia de INH y RIF. (Jiang et al. 2008; Gupta et al. 2010; Louw et al. 2011; Calgin et al. 2013).

Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE): Estas proteínas funcionan como antitransportadores, la mayoría de ellos son accionados por un gradiente de iones Na⁺ aunque algunos se valen de un gradiente de protones. Sus sustratos incluyen Fluorquinolonas, aminoglucósidos, y colorantes catiónicos (Balganesh et al. 2012).

Resistance Nodulation-Cell Division Superfamily (RND): Es una familia de bombas presentes en bacterias Gram negativas, constituidas por tres elementos: una proteína transportadora situada en la membrana interior, una proteína accesoria periplasmática y una proteína canal localizada en la membrana exterior. El eflujo a través de ellas es conducido gracias a la fuerza motriz de protones, un gradiente electroquímico en el que el movimiento de los iones de hidrógeno conduce el transporte del sustrato. Se ha descrito que el gen *mmpL7* contribuye al eflujo de INH (Domenech et al. 2005; Calgin et al. 2013).

Objetivos

Objetivo general

Identificar la presencia de mutaciones en genes asociados con resistencia fármacos de primera y segunda línea, así como bombas de eflujo en *M. bovis* presente en ganado bovino en Baja California

Objetivos específicos.

1. Identificación de mutaciones en genes asociados a fármacos de primera y segunda línea.
2. Identificar las mutaciones en genes de bombas de eflujo relacionados con resistencia a fármacos en *M. bovis*.

Material y Métodos

Este estudio se llevó a cabo en el estado de Baja California en donde participaron múltiples instituciones: Escuela de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), UABC, Rastro Municipal de Ensenada. Laboratorio Estatal de Tuberculosis, Hospital General, Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana y Veterinary Services Laboratories Iowa.

Declaración de Ética

Todos los procedimientos de manipulación de los animales y de toma de muestras se llevaron a cabo siguiendo las directrices de las técnicas locales oficiales aprobadas para el cuidado de los animales, incluyendo: el cuidado humanitario de los animales durante la movilización, estipulaciones de salud animal y las características de los animales durante el transporte (SAGARPA 1995a,1995c); aprobado por el comité institucional de ética animal que está representado por el Grupo Académico de Salud Animal y el Grupo Académico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas; ambos parte del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

Población de estudio y obtención de muestras

Muestras de aislados microbiológicos de humanos

Se colectaron 27 aislados microbiológicos de *M. bovis* de humanos provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado de TB pulmonar de muestras clínicas (esputo) del 2011 al 2013, sin historial médico de contacto con ganado bovino, los cuales recibieron tratamiento en el Laboratorio Estatal de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana en el estado de Baja California. Se tomó una porción de los 27 aislados microbiológicos y fueron enviados al Laboratory National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, donde se recultivaron y secuenciaron. Se contó con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes estudiados previa explicación de los objetivos y procedimientos del proyecto. Aprobado por el comité de bioética del Hospital General de Tijuana B.C

Muestras de ganado bovino

Se colectaron muestras de tejido de ganado bovino con lesiones sugestivas a TBB, en dos rastros de Baja California, de Agosto a Noviembre del 2015. El primer rastro fue el Rastro Tipo Inspección Federal 54 en Mexicali, B.C. El segundo fue el Rastro Municipal de Ensenada B.C. donde se sacrifica ganado proveniente de Ensenada, Tijuana, Tecate, Rosarito y Mexicali.

La inspección *postmortem* se realizó de acuerdo a lo que establece el Manual de inspección sanitaria para ganado vacuno sospechoso de tuberculosis (SENASICA

2011a). Las muestras decomisadas se colocaron en un envase estéril con cloruro de sodio al 0.9% para su posterior cultivo bacteriológico y análisis molecular, previamente rotulado. En el caso de obtener más de una muestra de un mismo animal esta se colocó en el mismo envase, ya que la unidad de análisis de resultados se refiere a animales y no a piezas anatómicas.

Se realizó un reporte el cual incluyó la presencia de lesiones granulomatosas, el área de su localización (ganglios linfáticos, cavidad torácica, pulmón, cavidad abdominal, hígado, riñones y múltiples tejidos), número de caso, fin zootécnicos y estado de procedencia. Las muestras se enviaron a Diagnostic Bacteriology Laboratory National Veterinary Services Laboratories a cargo de la Dra. Suelee Robbe-Austerman, en donde se les realizó el cultivo microbiológico, y la secuenciación de genoma completo.

Aislados microbiológicos

Los aislados microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratory National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa.

Ganado bovino

La manipulación del tejido se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, se utilizaron instrumentos quirúrgicos estériles y una nueva superficie de corte para cada muestra, se seleccionó aproximadamente 2 g de tejido con lesión y material caseoso adyacente y se procedió a la descontaminación mediante el método Petroff.

Los sedimentos obtenidos se sembraron en medio de cultivo Stonebrink y se incubó durante un mínimo de ocho semanas a 37 °C. Los cultivos fueron examinados macroscópicamente a intervalos semanales durante el periodo de incubación para observar crecimiento.

Aislados de M. bovis en humanos

La manipulación de los aislados microbiológicos se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, se utilizaron instrumentos estériles, para tomar una porción del crecimiento y fueron sembraron en medio de cultivo Stonebrink, se incubó durante un mínimo de ocho semanas a 37 °C. Los cultivos fueron examinados macroscópicamente a intervalos semanales durante el periodo de incubación para observar crecimiento.

Análisis genético

El análisis genético, extracción de ADN y la identificación molecular se realizó en Laboratory National Veterinary Services Laboratories.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó directamente de los aislados microbiológicos de las muestras clínicas bajo condiciones de BSL3. La extracción de ADN se realizó utilizando 500 mg de la masa bacilar homogenizados con 100 µL solución de lisis (10mM Tris-HCl [pH 8.3], 2mM MgCl₂, 50 mM KCl). Y se siguió el siguiente procedimiento: Incubar a 15 min a 95° C, centrifugar 10 min a 6000 rpm, transferir

sobrenadante a tubo limpio y etiquetado, posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis (Marcos et al. 1999). La calidad y cantidad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*®.

Identificación molecular de *M. bovis*

Las muestras de ADN obtenidas de aislados clínicos se identificaron mediante la amplificación de una región del operón *mce-3*, el cual permite diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Para lo cual se realizó una PCR multiplex con tres cebadores en un volumen total de 25 µL, la cual consiste de 2.5 µL de ADN, 25 pmol de cada primer, 200 mM de cada dNTPs, 1.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 0.01% (w/v) gelatina. El perfil de temperatura fue de un ciclo de 94 °C x 5 min, seguido de 30 ciclos, de 94 °C x 1 min, 52.3 °C x 1.5 min, y 72 °C x 1 min y un ciclo final de 72 °C x 5 min. La calidad y cantidad de los productos amplificados se evaluó en geles de agarosa al 1.4% a 100 mV por 20 min teñidos con *Gelstar*®. Si la cepa se identificó como *M. tuberculosis* amplificó un producto de 337 pb, mientras que *M. bovis* amplificó un producto de 168 pb (Bakshi et al. 2005). Se incluyó en todas las PCRs la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG como controles positivos y como control negativo agua nanopura grado molecular. Los datos de identificación molecular se compararon con los resultados obtenidos del cultivo microbiológico.

Secuenciación de Genoma Completo

La secuenciación de los genomas correspondientes se llevó a cabo en Diagnostic Bacteriology Laboratory National Veterinary Services Laboratories con el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, California, USA) por el método de secuenciación tipo Paired-End (PE) de Illumina. Se prepararon las muestras de ADN de acuerdo con el sistema MiSeq, descrito por el fabricante. Se utilizó 2ng de ADN genómico para la preparación de la muestra. Se realizó la fragmentación y se procedió a etiquetar el ADN genómico mediante un proceso llamado Tagmentación, por el kit de Nextera XT. Se realizó el aislamiento de ADN por el kit AMPure XP beads. Posteriormente se normalizó la librería genómica y se secuenció por MiSeq de Illumina con el método Paired-End y se amplificó por puenteo, haciendo una corrida de 2×150 pb.

Ensamble y alineamiento

Una vez obtenidas las lecturas de las secuencias se utilizó el programa FasQ, el cual analizó la calidad de la secuenciación, para posteriormente proceder al ensamble del ADN el cual se realizó el mediante el programa A5 que utiliza un comando de trimmomatic para las secuencias de illumina, al cual se le incluyó un parámetro de calidad mínima de 20 y para secuencias de longitud mínima de 50pb, para el análisis métrico del ensamblaje se utilizó el programa QUAST. Posteriormente el genoma se alineó al genoma de referencia *AF2122/97*, mediante la aplicación de programa Contiguator (servidor en línea). A las secuencias ordenadas

se les realizó una anotación de función mediante el programa RAST on line, de donde se extrajeron las secuencias de los genes de interés.

Análisis de mutaciones

Una vez obtenidas las secuencias de los genes de interés (Tabla X, XI, XII), se realizó la alineación, el análisis de los nucleótidos y traducción a aminoácidos mediante el programa Mega versión 6 (Tamura et al. 2013). Del análisis de nucleótidos se obtuvo la posición del cambio de la base nucleotídica, para posteriormente traducir la secuencia a aminoácidos, para identificar las mutaciones sinónimas, no sinónimas y deleciones, posteriormente se determinó la frecuencia de aparición de cada una de ellas, en comparación con las secuencias respectivas a cada gen con las cepas de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AD2122/97*.

Tabla X. Fármacos y genes asociados a farmacoresistencia a drogas de primera línea y mutaciones compensatorias.

Fármaco	Gen	Descripción del gen	Gen ID*	Tamaño pb
Etambutol (ETB)	<i>Rv0340</i>	Proteína Hipotética	886514	540
	<i>moaR1</i>	Regulador transcripcional	888825	870
	<i>PPE49</i>	Familia de proteína PPE	1093107	1176
	<i>manB</i>	Fosfamanomutasa	1093988	1398
	<i>embA</i>	Indoliacetilinositol arabinosiltransferasa	1093655	3285
	<i>embB</i>	Indoliacetilinositol arabinosiltransferasa	1093651	3297
	<i>embC</i>	Indoliacetilinositol arabinosiltransferasa	1093216	3285
Estreptomina (STR)	<i>rrs</i>	Ribosomal RNA 16s	1090640	1537
	<i>rpsL</i>	30S proteína ribosomal S12	1091822	375
	<i>gidB</i>	16S rRNA metiltransferasa	1093956	675
Pirazinamida (PZA)	<i>pncA</i>	Pirazinamidasa	1094126	560
	<i>rpsA</i>	30S proteína ribosomal S1	1092593	1446
	<i>panD</i>	Aspartato alfa-descarboxilasa	1093290	420
Isoniacida (INH)	<i>fbpC</i>	Antígeno secretado 85-C FbpC	1090815	1023
	<i>IniA</i>	Gen inducible a proteína iniA por isoniazida	1091225	1923
	<i>IniC</i>	Gen inducible a proteína iniC por isoniazida	1091229	1482
	<i>fabG1</i>	3-oxoacil-ACP reductasa	1092376	744
	<i>InhA</i>	Enoyl-ACP reductasa	1092377	810
	<i>Rv1592c</i>	Proteína hipotética	886287	1341
	<i>ndh</i>	NADH -deshidrogenasa	1093011	1392
	<i>katG</i>	Catalasa-peroxidasa-peroxinitritasa T KATG	1093267	2223
	<i>furA</i>	Proteína de regulación captación de hierro	1093308	453
	<i>srmR</i>	Proteína hipotética	888624	1245
	<i>fabD</i>	S-maloniltransferasa	1091405	909
	<i>kasA</i>	3-oxoacil-ACP sintetasa	1091409	1251
	<i>accD6</i>	Acetil-/propionil-CoA carboxilasa subunidad beta	1091411	1422
	<i>ahpC</i>	Alkil hidroperóxido reductasa	1094259	588
	<i>efpA</i>	Proteína EfpA de eflujo de la membrana	1092238	1593
	<i>fadE24</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	1093471	1407
<i>nat</i>	Arilamina acetilasa	1093447	852	
Rifampicina (RIF)	<i>rpoB</i>	DNA- RNA polimerasa subunidad beta	1091804	3519
	<i>rpoA</i>	DNA- RNA polimerasa subunidad alfa	32288725	1044
	<i>rpoC</i>	DNA- RNA polimerasa subunidad beta	1091805	3950

*Tomado de National Center for Biotechnology (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pb: pares de bases.

Tabla XI. Fármacos y genes asociados a farmacorresistencia a drogas de segunda línea.

Fármaco	Gen	Descripción del gen	Gen ID	Tamaño pb
Kanamicina (KAN) Amikacina (AMK) Capreomicina (CAP)	<i>rrs</i>	Ribosomal RNA 16s 16S/23S rRNA	1090640	1537
	<i>tlyA</i>	(cytidine-2'-O)- methyltransferase TlyA	1092670	806
	<i>thyA</i>	Timidilato sintetasa	1091588	792
	<i>eis</i>	Enhanced intracellular survival protein <i>eis</i>	32286825	1227
Etionamida (ETO)	<i>fabG1</i>	3-oxoacil-ACP reductasa	1092376	744
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductasa	1092377	810
	<i>ethA</i>	Monooxigenasa ETHA	1093885	1470
Fluroquinolonas (FQ)	<i>gyrA</i>	DNA girasa subunidad A	1090748	2517
	<i>gyrB</i>	DNA girasa subunidad B	1090747	2145

*Tomado de National Center for Biotechnology (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pb: pares de bases.

Tabla XII. Genes de bombas de eflujo asociados a farmacorresistencia

Gen	*Descripción del gen	**Eflujo de fármacos	**Regulada por fármacos	*Gen ID	Tamaño pb
<i>Rv1258c</i>	Transportador de eflujo de múltiples fármacos	INH, RIF, EMB, OFL,	INH, RIF, OFL	887056	1260
<i>Rv1410c</i>	Proteína a integral de la membrana transporte de aminoglucósidos / tetraciclina		INH, RIF	886709	1557
<i>Rv1747</i>	ABC transportador, proteína de unión al ATP/permeasa	INH		885311	2598
<i>bacA</i>	Transportador de vit B12, proteína de unión al ATP BacA		INH, RIF	885539	1920
<i>Rv3239c</i>	Proteína transportadora transmembrana		RIF	888856	3147
<i>drxA</i>	Proteína transportadora ABC Drra daunorubicina-DIM-transporte de unión a ATP	STR, EMB, RIF, TET		1092145	996
<i>emrB</i>	Resistencia a múltiples fármacos de proteína de eflujo de membrana integral	RIF		1092529	1623
<i>mmr</i>	Resistencia a múltiples fármacos de proteína de eflujo de membrana integral	ERY	INH, EMB	1093511	324

*Tomado de National Center for Biotechnology (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); pb: pares de bases. ERY: Eritromicina.

Resultados

Aislados microbiológicos

Ganado bovino

De las 170 muestras con resultado de micobacteriosis compatible, se logró obtener el 92.3% (157) aislados microbiológicos, de los cuales el 99.4% (155) se identificó molecularmente *M. bovis*, y en un caso se obtuvo crecimiento mixto identificándose *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium fortuitum* (*M. farcinogenes* o *M. senegalense*).

Humanos

De los 27 aislados microbiológicos enviados para su recultivo solo se logró obtener crecimiento en el 63% (17), de los cuales el 100% (17), se identificó molecularmente como *M. bovis* (Laniado-Laborín et al. 2014).

Secuenciación de genoma completo

Se obtuvieron 172 Secuencias de Genoma Completo de aislados microbiológicos de *M. bovis*. 155 (90 %) provenientes de ganado bovino y 17 (10%) de humanos. De las 45 muestras restantes en dos no se logró realizar el ensamble debido a baja calidad de la secuenciación y las restantes no se secuenciaron debido a la falta de crecimiento en el medio de cultivo. La profundidad media de cobertura fue 94X con un rango de 51 - 150X .

Mutaciones identificadas en comparación con la cepa *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*

En total se analizaron 47 genes, 33 asociados a resistencia a fármacos de primera línea, seis asociados a resistencia a fármacos de segunda línea y ocho asociados al eflujo de fármacos. Para todos los genes se analizaron 172 secuencias.

Al comparar los 172 genomas de *M. bovis* con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* se detectaron 33 genes con mutaciones, mientras que al comparar los genomas con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97* se detectaron 29 genes con mutaciones. De estos, 20/33 genes están asociados a resistencia a fármacos de primera línea y se observaron mutaciones en todos al compararlos con la cepa *M. tuberculosis H37Rv* en donde se observó un total de 47 mutaciones, de las cuales el 53% son mutaciones no sinónimas y el restante mutaciones sinónimas. Sin embargo, al comparar con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*, solo se identificaron mutaciones en 17 de los 20 genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea con un total de 31 mutaciones, de las cuales, el 54% presentó mutaciones no sinónimas y el resto mutaciones sinónimas (Tabla XIII y Anexo 1).

Con respecto a los seis genes analizados asociados a resistencia a fármacos de segunda línea, se observaron mutaciones en cinco genes al comparar con *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*. Con respecto a *M. tuberculosis* se observaron 17 mutaciones, de las cuales el 82% son no sinónimas, mientras que al

comparar con *M. bovis* , se observaron ocho mutaciones, las cuales todas son no sinónimas (Tabla XIV, Anexo1).

Con respecto a los ocho genes asociados al eflujo de fármacos, al comparar con *M. tuberculosis H37Rv* se detectaron mutaciones en todos los genes dando un total de 15 mutaciones, de las cuales el 46.6% son no sinónimas. Al comparar con *M. bovis AF2122/97*, se detectaron mutaciones solo en siete genes, dando un total de 10 mutaciones, de las cuales el 60% son no sinónimas (Tabla XV y Anexo 1).

En total se observaron 16 mutaciones no sinónimas presentes en el 100% de los genomas analizados, al comparar con *M. tuberculosis*, de las cuales se presentaron ocho mutaciones en siete genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea (*pncA*, *rpsA*, *PPE49*, *embC*, *iniA*, *Rv1592c* y *katG*), seis mutaciones en dos genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea (*gyrA* y *gyrB*) y dos mutaciones en dos genes asociados a bombas de eflujo de fármacos (*bacA* y *ddrA*) las cuales se describen a posteriormente (se resaltaran en negritas), así como las demás mutaciones no sinónimas observadas (Tabla XIII-XV). Las mutaciones sinónimas observadas se encuentran en el Anexo 1.

Mutaciones en genes relacionados con resistencia a fármacos de primera línea

En esta sección solo se describen las mutaciones no sinónimas identificadas al compararse con los genomas de las cepas de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*.

Pirazinamida

Los tres genes analizados *pncA*, *panD* y *rpsA* que confieren resistencia a PZA presentaron mutaciones no sinónimas con respecto a *M. tuberculosis* y solo *pncA* y *panD* con respecto a *M. bovis*.

En el gen *pncA* se reportan dos mutaciones con respecto a *M. tuberculosis*. El 100% de los genomas presentan la mutación **H57D**, la cual es característica del genoma de *M. bovis*. Esta mutación inactiva a la enzima pirazinamidasa generando resistencia a PZA (Scorpio & Zhang 1996; Zhang & Mitchison 2003; Said Fernández et al. 2005). La segunda mutación G162S se observó con respecto a *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis*, y ésta ha sido reportada anteriormente en aislados de *M. tuberculosis* (Mitarai et al. 2012). Esta mutación no se presentó en genomas de *M. bovis* aislados de humanos.

En el gen *panD*, se observó la mutación S8A con respecto a *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esta mutación se reporta por primera vez en este estudio y se observó en el

32.8% de los genomas de ganado lechero, en 11.5% de los genomas de ganado de carne y en el 29.4% de los genomas de humanos.

En el gen *rpsA*, se observa la mutación **A440T** en el 100% de los genomas, solo con respecto a *M. tuberculosis*, debido que en *M. bovis* esta mutación es considerada como un polimorfismo entre estas dos especies (Tan et al. 2014) (Tabla XIII).

Estreptomicina

Para el fármaco STR, solo dos de los tres genes analizados presentaron mutaciones con respecto a *M. tuberculosis* y *M. bovis* las cuales se reportan por primera vez en este estudio y se describen a continuación. El gen *rrs* se presentó la mutación C2F la cual se observó en el 4.6% de los genomas de ganado lechero y en el 4.6% de los genomas provenientes de ganado de carne. El gen *gidB* presenta la mutación P29L, presente en el 3.8% de los genomas de bovinos de carne. Interesantemente, en el gen *rpsL* de importancia para la resistencia a STR no se presentaron mutaciones.

Rifampicina

Para el fármaco RIF, solo dos de los tres genes analizados presentaron mutaciones con respecto a *M. tuberculosis* y *M. bovis* las cuales se reportan por primera vez en este estudio. El gen *rpoA* presentó la mutación E91G en el 12.4% de ganado lechero, 7.6% en aislados de bovinos de carne y 29.4% en genomas aislados

de humano El gen *rpoC* presentó la mutación A724V observada en el 2.3% de genomas provenientes de ganado lechero (Tabla XII). En el gen *rpoB*, con relevancia para resistencia a RIF solo se observaron mutaciones sinónimas (Tabla XVI).

Isoniacida

Para INH se observaron mutaciones no sinónimas en cinco de los 17 genes analizados. Para el gen *Rv1592c*, *katG* e *iniA* se observaron mutaciones en el 100% de los genomas solo al compararse con *M. tuberculosis*. Las mutaciones reportados son **I322V** *Rv1592c*, (Ramswamy et al., 2003:), **R463L** *katG*, (Brossier et al. 2006) **N88S** y **H481Q** (*iniA* reportadas por primera vez en este estudio) (Tabla XIII).

En el gen *srmR* se observó la mutación A3563T con respecto a *M. tuberculosis* y *M. bovis AF2122/97*, la cual solo se identificó en un genoma aislado de bovino de leche, esta mutación no se ha reportado anteriormente (Tabla XIII).

Para el gen *nat* se observó la mutación L41P en comparación con *M. tuberculosis* y *M. bovis* y solo se presentó en el 2.3% de los genomas provenientes de bovino de leche y es reportada por primera vez en este estudio (Tabla XIII).

Etambutol

Para ETB se observaron mutaciones en tres (*embC*, *embA*, *PPE49*) de los siete genes analizados. El gen *embC* fue el que presentó el mayor número de mutaciones, cinco en comparación con *M. tuberculosis* y cuatro con *M.bovis*.

La mutación **T270I** *embC* (Sreevatsan et al. 1997c) y la **A38V** *PPE49*, reportada por primera vez en este estudio) se presentaron el 100% de los genomas solo en comparación con *M. tuberculosis*. Las mutaciones R927H *embA*, W356R *embC* y T1036I *embC*, se presentaron en el 4% de los genomas provenientes de ganado lechero y la mutación M579L *embC* se observó en 7.6% de los genomas provenientes de bovinos de carne (Tabla XIII).

En el gen *embA*, se identificaron tres mutaciones en comparación con ambas cepas de referencia, estas se observaron en el 4% de los genomas provenientes de ganado lechero, las cuales son P958Q *embA*, F44S *embA*, V290A *embA* y se reportan por primera vez en este estudio (Tabla XIII).

Tabla XIII. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF2122/97*.

Fármaco	Gen	Mutaciones no	% Bovinos	% Bovinos	Humanos	Reportada
PZA	<i>pncA</i>	H57D*	100	100	100	Si ^R (Scorpio, y Zhang. 1996).
		G162S	19.5	11.5	-	Si [?] (Mitarai. et al., 2012)
	<i>panD</i>	S8A	32.8	15.3	29.4	No
	<i>rpsA</i>	A440T*	100	100	100	Si (Tan et al., 2014)
STR	<i>rrs</i>	C2F	4.6	7.6	-	No
	<i>gidB</i>	P29L	-	3.8	-	No
	<i>PPE49</i>	A38V*	100	100	100	No
	<i>embA</i>	P958Q	2.3	-	-	No
F44S		0.78	-	-	No	
ETB		V290A	0.78	-	-	No
		T270I*	100	100	100	Si (Goude et al., 2009)
	<i>embC</i>	R927H	1.5	-	-	No
		W356R	1.5	-	-	No
		M579L	-	7.6	-	No
		T1036I	0.78	-	-	No
	<i>iniA</i>	N88S*	100	100	100	No
		H481Q*	100	100	100	No
INH	<i>Rv1592c</i>	I322V*	100	100	100	Si (Coker et al., 2016)
	<i>ndh</i>	R284W**	.78	7.6	5.8	No
		W284R***	99%	92%	94%	
		R231Q	1.5	-	-	No
		Q345R	1.5	-	-	No
		V73A	-	7.6	-	No
	<i>katG</i>	R463L*	100	100	100	Si (Van Doorn et al., 2001)
	<i>srmR</i>	A353T	0.78	-	-	No
<i>nat</i>	L41P	2.3	-	-	No	
RIF	<i>rpoA</i>	E91G	12.4	7.6	29.4	No
		K213R	0.78	-	-	No
	<i>rpoC</i>	A724V	2.3	-	-	No

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*. ** Mutación que solo se presentó en comparación con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*. *** Mutación que solo se presentó en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv*. Sombreado en gris: mutación en el mismo codón con diferentes cambios según la comparación con las cepas de referencia. - : no se reportan mutaciones

^R: Resistente, [?] No se ha comprobado causa farmacoresistencia para PZA.

Mutaciones en genes relacionados a resistencia a fármacos de segunda línea

Kanamicina, Amikacina

Para estos fármacos se analizaron tres genes de los cuales solo se observaron mutaciones en dos (*eis* y *rrs*).

En el gen *eis* se observaron cuatro mutaciones, presentes al comparar ambas cepas de referencia. La mutación T76A, se observó en el 97% de genomas de bovinos de leche, 100% en bovinos de carne y humanos. La mutación R173S se observó solo en un genoma de bovino de leche. La mutación P226A se observó en el 5.4% de genomas de bovinos de leche y 15.3% en bovinos de carne. Por último, la mutación R359W se observó solo en un genoma proveniente de ganado de carne. Estas cuatro mutaciones no se han reportado anteriormente (Tabla XIV). El gen *rrs* se describió anteriormente en el fármaco STR.

Capreomicina

En el gen *tlyA* se observó solo la mutación V32A presente al comparar ambas cepas de referencia, observada solo en un genoma proveniente de ganado lechero (Tabla XIV).

Etionamida

Se analizaron tres genes, de los cuales solo *ethA* presentó una mutación P484S, en comparación con ambas cepas de referencia. Esta mutación se reporta en

el 1.5% de los genomas de ganado lechero, la cual es reportado por primera vez en este estudio. (Tabla XIV).

Fluorquinolonas

Para este fármaco los dos genes analizados presentaron mutaciones (*gyrA* y *gyrB*). En el gen *gyrA* se observaron cinco mutaciones al comparar con *M. tuberculosis*, cuatro se presentaron en todos los genomas, **E21Q** *gyrA*, ((Devasia et al., 2012), **S95T** *gyrA*, (Lau et al. 2011) **G668D** *gyrA* (Lau et al. 2011)y **G369A** *gyrA* reportada por primera vez en este estudio. La mutación A132V *gyrA*, se presentó al comparar ambas cepas de referencia en un genoma proveniente de ganado de lechero, y no se ha reportado anteriormente (Tabla XIV).

En *gyrB*, se presentaron tres mutaciones, dos presentes en todos los genomas al comprar con *M. tuberculosis*, **A248S** *gyrB* y **A442S** *gyrB*, las cuales no han sido reportadas anteriormente. La mutación A227P *gyrB* se presentó al comparar ambas cepas de referencia, se observó en un genoma proveniente de ganado de leche, la cual es reportada por primera vez en este estudio. (Tabla XIV).

Tabla XIV. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M. bovis AF212297*

Fármaco	Gen	Mutaciones no sinónimas	% Bovino de leche (129)	% Bovinos de carne (26)	% Humanos (17)	Reportada
<i>ETO</i>	<i>ethA</i>	P484S	1.5	-	-	No
<i>AMK, KAN</i>	<i>eis</i>	A76T**	3.1	-	-	No
		T76A***	97	100	100	
		R173S	0.78	-	-	No
		P226A	5.4	15.3	-	No
		R359W	-	3.8	-	No
<i>CAP</i>	<i>tlyA</i>	V32A	0.78	-	-	No
<i>FLQ</i>	<i>gyrA</i>	E21Q*	100	100	100	Si (Devasia et al., 2012)
		S95T*	100	100	100	Si (Devasia et al., 2012)
		D639A*	100	100	100	No
		G668D*	100	100	100	Si (Devasia et al., 2012)
		A132V	0.78	-	-	No
	<i>gyrB</i>	A248S *	100	100	100	No
		A442S*	100	100	100	No
		A277P	0.78	-	5.8	No

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*.

** Mutación en comparación con la con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*.

*** Mutación en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv*

Sombreado en gris: mutación en el mismo codón con diferentes cambios según la comparación con las cepas de referencia

–: No hay mutaciones.

Mutaciones en genes asociados a bombas de eflujo de fármacos

De ocho genes analizados se observaron mutaciones en seis genes (*Rv1258c*, *bacA*, *Rv3239c*, *emrB*, *mmr* y *ddrA*) al ser comparados con *M. tuberculosis* y cuatro con *M. bovis* (*Rv1258c*, *Rv3239c*, *emrB*, *mmr*). Las mutaciones V191A *Rv3239c*, R1010I *Rv3239c*, L328V *emrB* L178F *emrB* y M86I *mmr*, se observaron al comparar ambas cepas de referencia, las cuales se observaron en el 10% de los genomas provenientes de ganado lechero, las mutaciones anteriormente escritas se reportan por primera vez en este estudio. Las mutaciones **I603V** *bacA* y **H309D** *ddrA*, se presentaron en todos los genomas al comparar con *M. tuberculosis*. (XV). Por último, la mutación G274A *Rv1258c*, se presentó en comparación con ambas cepas de referencia, en el 7.6% de los genomas de bovinos de carne, esta mutación no se ha reportado anteriormente (XV).

Tabla XV. Mutaciones no sinónimas y frecuencia en genes asociados a bombas de eflujo en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv* y *M.bovis AF212297*

Fármaco	Gen	Mutaciones no sinónimas	%Bovinos lecheros (129)	%Bovinos de Carne (26)	%Humanos (17)	Reportada
INH, RIF, EMB	<i>Rv1258c</i>	G274A	-	7.6	-	No
INH, RIF	<i>bacA</i>	I603V *	100	100	100	No
RIF	<i>Rv3239c</i>	V191A	1.5	-	5.8	No
		R1010I	1.5	-	-	No
	<i>ddrA</i>	H309D*	100	100	100	No
RIF	<i>emrB</i>	L328V	2.6	-	-	No
		L178F	3.1	-	-	No
INH, EMB	<i>mmr</i>	M86I	1.5	-	-	No

* Mutaciones que no se presentaron al comparar los aislados con la cepa de referencia *M. bovis AF2122/97*.

Tabla XVI. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a resistencia en fármacos de primera línea.

Fármaco	Gen	Mutación N/C	Bovinos de leche (129)	Bovinos de Carne (26)	Humanos (17)	Reportada	Sensibilidad
PZA	<i>pncA</i>	C169G/ H57D	*	*	*	Si	Resistente
		G484A/ G162S	TB-50, TB-77, TB-81, TB-83, TB-84, TB-85, TB-97, TB-99, TB-102, TB-104, TB-105, TB-121, TB-122, TB-127, TB-142, TB-143, TB-147, TB-151, TB-162, TB-163-TB-167, TB-169, TB-170, TB-186, TB-188, TB-191, TB-192,	TB-50, TB-98, TB-143		Si	Desconocida
	<i>panD</i>	T22G/S8A	TB-21, TB-30, TB-44, TB-50, TB-53, TB-76, TB-77, TB-81, TB-82, TB-83, TB-84, TB-85, TB-90, TB-91, TB-97, TB-102, TB-104, TB-105, TB-112, TB-121, TB-122, TB-125, TB-127, TB-138, TB-139, TB-142, TB-143, TB-144, TB-147, TB-148, TB-151, TB-153, TB-162, TB-163, TB-167, TB-168, TB-169, TB-170, TB-177, TB-186, TB-189, TB-191, TB-192,	TB-21, TB-44, TB-50, TB-143	11-C329RM, 12-C335RM, 12-C337RM, 12-C345RM, 14-HGTJ358RS		

			TB-196 TB-202, TB205				
	<i>rpsA</i>	G1318A/ A440T	*	*	*	Si	Sensible
STR	<i>rrs</i>	G5T/C2F	TB-80, TB-124, TB-109, TB-120, TB-145, TB-146	TB-03, TB-04	-		
	<i>gidB</i>	C86T/P29L	TB-32	-	-		
		A615G/A205A	*	*	*		
RIF	<i>rpoB</i>	T3225C/ A1075A	*	*	*		
		C2709T/ D903D	TB-149				
	<i>rpoA</i>	G273T/E91K	TB-30, TB-53, TB-76, TB-82, TB-90, TB-91, TB-125 TB-138, TB-, 139, TB-144, TB-148, TB-153, TB-189, TB-196, TB-202, TB-205	TB-21, TB-44	11-C329RM, 12-C335RM, 12-C337RM, 12-C345RM, 14-HGTJ358RS		
		A638G/K213R	TB-165				
		T633G/A211A	TB-204				

	<i>rpoc</i>	C2171T/A724V	TB-147, TB167, TB168				
<i>ETB</i>	<i>Rv0340</i>	C192T/ G64G	TB-197, TB-198, TB- 199, TB-200	-	-		
	<i>PPE49</i>	C113T/ A38V	*	*	*		
		T795C/ A265A	TB-197, TB-198, TB- 199, TB-200				
	<i>embA</i>	C988T/ T329T	*	*	*		
		C2873A/ P958Q	TB-197, TB-198, TB- 199				
		T131C/ F44S	TB-76	-	-		
		T869C/ V290A	TB-132	-	-		
	<i>embB</i>	C351T/ V117V	*	*	*		
		A1133C/ A338A	*	*	*		
	<i>embC</i>	A417G/ L139L	*	*	*		
		C809T/ T270I	*	*	*		
		C2781T/ R927H	*	*	*		

		C3108T/ T1036I	TB-191				
		G1614A/ L538L	-	TB-32			
		A1735C/M579L	-	TB-36,TB-37	-		
		T1066C/ W356R	TB-118, TB-119				
		G2780A/ R927H	TB-164, TB-166				
		C3107T/ T1036I	TB-191				
		C3108T/T1036T	*	*	*		
	<i>iniA</i>	A263G/ N88S	*	*	*		
		T1443G/ H481Q	*	*	*		
		A636G/ E212E	TB-164, TB-166				
	<i>Rv1592c</i>	A963G- A964G/ I322V	*	*	*		
		G60A/ P20P	TB-197, TB-198, TB- 199, TB-200	-	-		
	<i>ndh</i>	T850C/W284R	99%, exepto: TB-180, TB-178,	92%, exepto: TB-47	94%, exepto: 12-C343RM		

<i>INH</i>		C850T/R284W	TB-180, TB-178,	TB-47	12-C343RM			
		G692A/R231Q	TB-179	-	-			
		A1304G/Q435R	TB-148, TB204	-	-			
	<i>katG</i>		C87A/ P29P	*	*	*		
			C609T/ T203T	*	*	*		
			C1388T/ R463L	*	*	*	Si	Sensible
			T218C/ V73A	-	TB-36, TB-37			
			G324A/ R78R	TB-103	-	-		
	<i>srmR</i>		G336T/ V112V	*	*	*		
			G1057A/ A353T	TB-112				
	<i>fabD</i>		C657T/ A219A	TB-105				
	<i>kasA</i>		G1047A/ A349A	TB-78	-	12-C343		
	<i>accD6</i>		T600C/ D200D	*	*	*		
	<i>nat</i>		T122C/ L41P	TB132, TB-134, TB-	-	-		

			184				
--	--	--	-----	--	--	--	--

N/C: Posición nucleotídica/Codón, *: Se presentó la mutación en el 100% de los genomas. Nota: Todas las mutaciones que se observaron en el 100% de los genomas solo se presentaron al comparar con la cepa *M. tuberculosis H37Rv* y al comparar con *M. bovis AF2122/97* no se presentaron.

Tabla XVII. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea.

Fármaco	Gen	Mutación N/C	Bovinos de leche (129)	Bovinos de Carne (26)	Humanos (17)	Reportada	Sensibilidad
ETO	<i>ethA</i>	C1452T/ P484S	TB-164, TB-166				
AMK, KAN	<i>eis</i>	C1075T/ R359W		TB-01			
		C376G/ P226A	TB-46, TB78, TB-79, TB-129, TB-136, TB-141, TB-178	TB-17, TB-33, TB-52, TB- 53	*		
		A519C/ R173S	TB -196	-	-		
		A336G/ T76A	Excepto:TB-197, TB-198, TB-199, TB-200	*	*		
		G336A/A76T	TB-197, TB-198, TB-199, TB-200	-	-		
CAP	<i>tlyA</i>	A33G/L11L	*	*	*		
		T95C/V32A	TB-179	-	-		
FLQ	<i>gyrA</i>	G61C/E21Q	*	*	*	Si	
		G284C/S95T	*	*	*	Si	
		C1440T/R495R	*	*	*		

		A1916C/D639A	*	*	*		
		G2003A/ G668D	*	*	*	Si	
		C395T/ A132V	TB-46				
	<i>gyrB</i>	G630A/V210V	*	*	*		
		C1284T/A428S	*	*	*		
		G1324T/A442/S	*	*	*		
		G829C/A227P	TB-78	-	12_C342RM		

*: Se presentó la mutación en el 100% de los genomas. Nota: Todas las mutaciones que se observaron en el 100% de los genomas solo se presentaron al comparar con la cepa *M. tuberculosis H37Rv* y al comparar con *M. bovis AF2122/97* no se presentaron.

Tabla XVIII. Relación de aislados con mutaciones en genes asociados a Bombas de eflujo

Fármaco	Gen	Mutación N/C	Bovinos de leche (129)	Bovinos de Carne (26)	Humanos (17)
INH, RIF, EMB	<i>Rv1258c</i>	G821C/ G274A	-	TB-03, TB-04	-
INH, RIF, OFL	<i>Rv1410c</i>	C1260A/ G420G	TB-98	-	-
INH	<i>Rv1747c</i>	G2331T/ S777S	*	*	*
		C318T/ H106H	TB-105		
INH, RIF	<i>bacA</i>	C1539T/ Y513Y	-	TB-32	-
		A1807G/I603V	*	*	*
RIF	<i>Rv3239c</i>	T572C/V191A	TB-53, TB-125	-	14-HGTJ358RS
		C1659T/Y553Y	Excepto: TB-36, TB-37, TB-78, TB-164, TB-166, TB-197, TB-198, TB-199, TB-200, 12_C343	-	-

		S2622G/ L874L	*	*	*
		G3029T/R1010I	TB-111		
	<i>ddrA</i>	C925G/H309D	*	*	*
RIF	<i>emrB</i>	C720T-C721T/ G240G	*	*	*
		T982G/ L328V	TB-115, TB-117, TB-126	-	-
		C532T/ L178F	TB-197, TB-198, TB-199, TB-200	-	-
INH, EM	<i>mmr</i>	G258A/ M86I	TB-148, TB-177	-	-

*: Se presentó la mutación en el 100% de los genomas. No existen reportes anteriores de estas mutaciones. Nota: Todas las mutaciones que se observaron en el 100% de los genomas solo se presentaron al comparar con la cepa *M. tuberculosis H37Rv* y al comparar con *M. bovis AF2122/97* no se presentaron.

Haplotipos de mutaciones

Se realizó un análisis de haplotipos en los 172 aislados de *M. bovis* basados en los genes que presentaron mutaciones no sinónimas en comparación con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AF2122/97. Se obtuvo un total de 36 haplotipos al comparar ambas cepas de referencia y se les asignó el número de haplotipo de mayor a menor frecuencia.

Frecuencia y relación de los Haplotipos con espoligotipos

El haplotipo 1, se mostró como el más frecuente (44%), el cual se presentó tanto en aislados de ganado lechero (42%), ganado de carne (42%) y humanos (58.8%). En este haplotipo se presentaron cuatro diferentes patrones de espoligotipo (SB0145, SB0162, SB1760, SB2468). En comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis* presentó las 16 mutaciones anteriormente descritas presentes en todos los genomas de analizados y las mutaciones W248R *ndh* y T76A *eis*. En comparación con la cepa de referencia *M. bovis* AF2122/97 este haplotipo no presentó mutaciones.

En las siguientes descripciones de los haplotipos no se detallan las mutaciones que porta cada uno (Tabla XXII).

En los haplotipos 2 y 3 con una frecuencia del 14% y 10%, respectivamente solo se observó el patrón de espoligotipo SB1040. El haplotipo 2 fue representado en su

mayoría por ganado lechero (13%), y con menor frecuencia por ganado de carne (1%). El haplotipo 3 fue representado por aislados provenientes tanto de ganado lechero (6.4%), como de ganado de carne (11.6%) y de humanos (2.3%).

El haplotipo 4, con una frecuencia del 5%, se presentó en ganado lechero (3%) y ganado de carne (2%), en donde se observaron dos patrones de espilogtipos SB0145 y SB1040, en donde el más predominante fue el SB0145 (4%).

Los haplotipos 5, 6 y 7 con una frecuencia del 3%, 1.7% y 1.7%, respectivamente fueron representados por ganado lechero (11%), el haplotipo 9 con una frecuencia del 1%, se representó por un aislado proveniente de ganado lechero y un aislado proveniente de ganado de carne, el haplotipo 10, con una frecuencia del 1% fue representado por aislados provenientes de ganado lechero (1%), el haplotipo 12 con una frecuencia del 1%, fue representado por aislados provenientes de ganado de carne (1 %). Los haplotipos 19, 20, 22, 25, y 29, con una frecuencia del 0.6% cada uno, fueron representados por un aislado proveniente de ganado lechero cada uno, el haplotipo 23 fue representado por un aislado proveniente de ganado de carne y el haplotipo 26 fue representado por un aislado proveniente de humano. Todos los haplotipos descritos anteriormente presentaron el patrón de espilogtipo SB0145.

El haplotipo 8 representado por ganado lechero (1.7%), se observó el patrón de espoligotipo SB1345, presente solo en este haplotipo.

El haplotipo 11, con una frecuencia de 1%, fue representado por aislados provenientes de ganado de carne (1.7%), y se observó el espoligo SB0327 presente únicamente en este haplotipo.

El haplotipo 13, con una frecuencia del 1%, fue representado por un aislado proveniente de ganado lechero y un aislado proveniente de humano. Los haplotipos 17, 18, 21, 24, 28, 31, 32, 33, 34 y 35 con una frecuencia de 0.6% cada uno fue representado por aislados provenientes de ganado lechero. El haplotipo 16 él fue representado por un aislado proveniente de ganado de carne. Los haplotipos descritos presentaron el patrón de espoligo SB1040.

El haplotipo 14, con una frecuencia del 1%, fue representado por aislados provenientes de ganado lechero (1%), y se observó el espoligo SB1758 presente únicamente en este haplotipo.

Interesantemente el haplotipo 15, con una frecuencia del 1% fue el único que fue representado por la combinación de un aislado proveniente de ganado de carne y un

aislado proveniente de humano con patrón de espoligotipos distintos, el aislado proveniente de ganado de carne fue el único el presentar el patrón de espoligotipo SB0986, el aislado proveniente de humano presento el patrón de espoligotipo SB0971, al igual que el haplotipo 27, el cual está representado por un aislado proveniente de ganado lechero, solamente estos dos aislados presentaron este patrón de espoligotipo.

Por último el haplotipo 30, con una frecuencia del 0.6%, fue representado por un aislado de ganado lechero y fue el único aislado que presentó el patrón de espoligotipo SB2469.

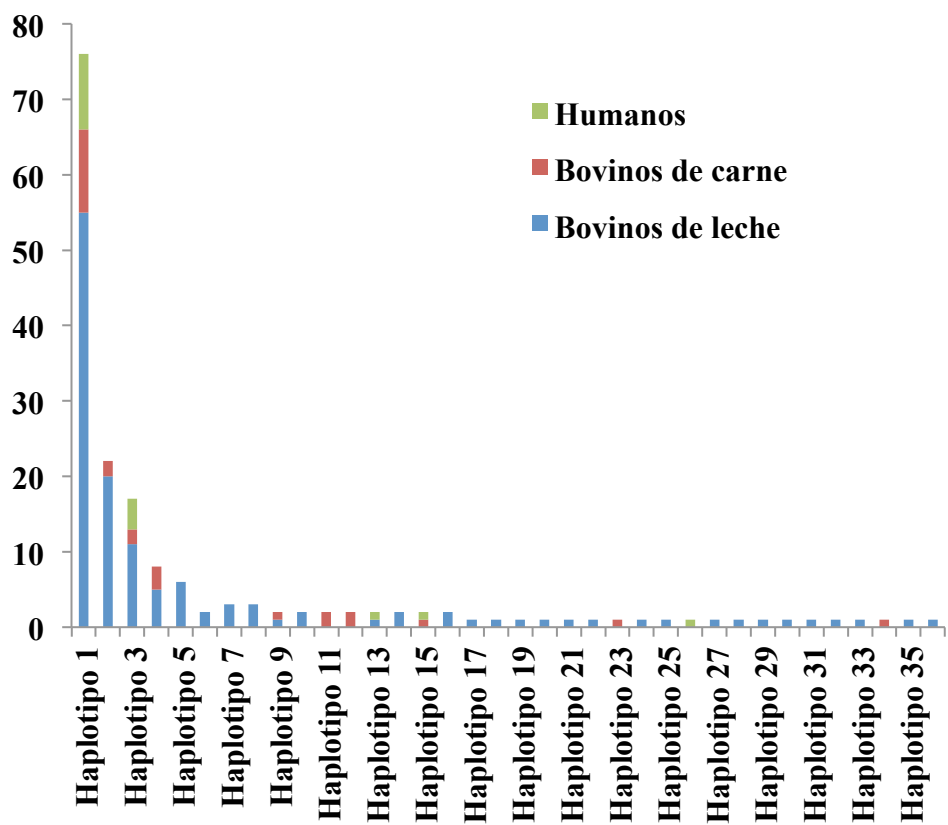


Figura 10. Frecuencia y distribución de los haplotipos, en ganado y humanos

Literatura citada

- Abalos P, Retamal P (2004) Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?. Rev Sci Tech **23**, 583-594.
- Adams LG (2001) In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Rev Sci Tech **20**, 304-324.
- Alangaden G, Kreiswirth B, Aouad A (1998) Antimicrob Agents Chemother **42**, 1295-1297.
- Aldwell FE, Wedlock DN, Slobbe LJ, Griffin JF, Buddle BM, Buchan GS (2001) In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. Tuberculosis (Edinb) **81**, 115-123.
- Alemayehu R, Girmay, M., Gobena, A. B. (2008) Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active tuberculosis in central Ethiopia. The Veterinary Journal **178**, 117-125.
- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M (2004) Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. Clin Infect Dis **39**, 783-789.
- Allix-Béguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P (2008) Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **46**, 1398-1406.
- Ammon A, Makela P (2010) Integrated data collection on zoonoses in the European Union, from animals to humans, and the analyses of the data. Int J Food Microbiol **139 Suppl 1**, S43-47.
- Andersson DI, Hughes D (2010a) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Micro **8**, 260-271.
- Andersson DI, Hughes D (2010b) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol **8**, 260-271.
- Ando H, Kitao T, T. M-A, Kato S, Mori T, Kirikae T (2011) Downregulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol **79**, 1615-1628.
- Armengol BR-SyL (2012) Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. Diagnóstico Prenatal **23**, 56-66.
- Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I (2004) Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **8**, 924-937.
- Baker MG, Lopez LD, Cannon MC, De Lisle GW, Collins DM (2006) Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. Epidemiol Infect **134**, 1068-1073.
- Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M (2005) Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. Vet Microbiol **109**, 211-216.
- Balganesh M, Dinesh N, Sharma S (2012) Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. Antimicrob Agents Chemother **56**, 2643-2651.

- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR (1994) inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **5144**, 227-230.
- Becerril-Montes P, Said-Fernández S, Luna-Herrera J, Caballero-Olín G, Enciso-Moreno JA, Martínez-Rodríguez HG, Padilla-Rivas G, Garza-Treviño NE, Molina-Salinas GM (2013a) A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2**, 160-166.
- Becerril-Montes P, Said-Fernández S, Luna-Herrera J, Caballero-Olín G, Enciso-Moreno JA, Martínez-Rodríguez HG, Padilla-Rivas G, Nancy-Garza-Treviño E, Molina-Salinas GM (2013b) A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**, 160-166.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**, 1520-1523.
- Bermúdez HR, Rentería ET, Medina BG, Hori-Oshima S, De la Mora Valle A, López VG (2012) Evaluation of a lateral flow assay for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **33**, 59-65.
- Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Vet Res* **36**, 411-436.
- Black PA, Warren RM, Louw GE, van Helden PD, Victor TC, Kana BD (2014) Energy Metabolism and Drug Efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 2491-2503.
- Bobadilla-del Valle M, Torres-González P, Cervera-Hernández ME, Martínez-Gamboa A, Crabtree-Ramirez B, Chávez-Mazari B, Ortiz-Conchi N, Rodríguez-Cruz L, Cervantes-Sánchez A, Gudiño-Enríquez T, Cinta-Severo C, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A (2015) Trends of *Mycobacterium bovis* Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **9**, e0004124.
- Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, Forrest SA, Bryant JM, Harris SR, Schuenemann VJ, Campbell TJ, Majander K, Wilbur AK, Guichon RA, Wolfe Steadman DL, Cook DC, Niemann S, Behr MA, Zumarraga M, Bastida R, Huson D, Nieselt K, Young D, Parkhill J, Buikstra JE, Gagneux S, Stone AC, Krause J (2014) Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* **514**, 494-497.
- Boshoff HI, Mizrahi V, Barry CE (2002) Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol* **184**, 2167-2172.
- Braibant M, Gilot P, Content J (2000) The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev* **24**, 449-467.

- Brosch R, Gordon, S. V., Marmiesse, M., et al. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 3684-3689.
- Brossier F, Sougakoff W, Bernard C, Petrou M, Adeyema K, Pham A, Amy de la Breteque D, Vallet M, Jarlier V, Sola C, Veziris N (2015) Molecular Analysis of the embCAB Locus and embR Gene Involved in Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**, 4800-4808.
- Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W (2006) Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low- and High-Level Resistance. Journal of Clinical Microbiology **44**, 3659-3664.
- Bryson DB, Hanna, J., Neill, S. D., Pollock, J. M. (1994) Pjatogenesis of *Mycobacterium bovid* infection in cattle. Veterinary Microbiology **40**, 41-53.
- Caimi K, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bigi F, Cataldi A (2001) Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol **39**, 1067-1072.
- Calgin MK, Sahin F, Turegun B, Gerceker D, Atasever M, Koksall D, Karasartova D, Kiyani M (2013) Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains. Diagn Microbiol Infect Dis **76**, 291-297.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, Bentley SD, Parkhill J, Nejentsev S, Hoffner SE, Horstmann RD, Brown T, Drobniewski F (2012) Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. Genome Research **22**, 735-745.
- Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT (1991) IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis complex* and its utilization in DNA fingerprinting. Mol Cell Probes **5**, 73-80.
- Caws M, Drobniewski FA (2001) Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. Ann N Y Acad Sci **953**, 138-145.
- Chen Y, Chao Y, Deng Q, Liu T, Xiang J, Chen J, Zhou J, Zhan Z, Kuang Y, Cai H, Chen H, Guo A (2009) Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) **89**, 95-100.
- Cheng F, Yew WW, Chan EW, Chin ML, Hui MM, Chan RC (2004) Multiplex PCR Amplimer Conformation Analysis for Rapid Detection of gyrA Mutations in Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY **59**, 596-601.
- Chiang CY, Centis R, Migliori GB (2010) Drug-resistant tuberculosis: past, present, future. Respirology **15**, 413-432.
- Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, P. C (2002) Overexpression and functional characterization of an ABC (-ATPbinding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochem. J **367**, 279-285.

- Cicero R, Olivera H, Hernández-Solis A, Ramírez-Casanova E, Escobar-Gutiérrez A (2009) Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **28**, 455-460.
- Cobos-Marín L, Montes-Vargas J, Zumarraga M, Cataldi A, Romano MI, Estrada-García I, González-y-Merchad JA (2005) Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. Canadian Journal of Microbiology **51**, 996-1000.
- Colangeli R, Arcus VL, Cursons RT, Ruthe A, Karalus N, Coley K, Manning SD, Kim S, Marchiano E, Alland D (2014) Whole Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Reveals Slow Growth and Low Mutation Rates during Latent Infections in Humans. PLOS ONE **9**, e91024.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature **393**, 537-544.
- Coll F, Mallard K, Preston MD, Bentley S, Parkhill J, McNerney R, Martin N, Clark TG (2012) SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. Bioinformatics **28**, 2991-2993.
- Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, Galagan J, Niemann S, Gagneux S (2012) Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. Nature genetics **44**, 106-110.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S (2013) Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. Nature genetics **45**, 1176-1182.
- Cordova E, Gonzalo X, Boschi A, Lossa M, Robles M, Poggi S, Ambroggi M (2012) Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology, microbiology and clinical presentation. Int J Tuberc Lung Dis **16**, 415-417.
- Cortés-Torres N, González-Y-Merchad JA, González-Bonilla C, García-Elorriaga G (2013) Molecular analysis of mycobacteria isolated in Mexican patients with different immunodeficiencies in a tertiary care hospital. Archives of Medical Research **44**, 562-569.
- Coscolla M, Gagneux S (2014) Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Seminars in immunology **26**, 431-444.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging Infectious Diseases **4**, 59-70.

- Cousins DV (2001) *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Revue Scientifique et Technique **20**, 71-85.
- Cowan LS, Crawford JT (2002) Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. Emerg Infect Dis **8**, 1294-1302.
- Crispell J, Zadoks RN, Harris SR, Paterson B, Collins DM, de-Lisle GW, Livingstone P, Neill MA, Biek R, Lycett SJ, Kao RR, Price-Carter M (2017) Using whole genome sequencing to investigate transmission in a multi-host system: bovine tuberculosis in New Zealand. BMC Genomics **18**, 180.
- Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas R (2010) [Drug resistant tuberculosis: molecular mechanisms and diagnostic methods]. Enferm Infecc Microbiol Clin **28**, 621-628.
- de Kantor IN, LoBue PA, Thoen CO (2010) Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **14**, 1369-1373.
- de Kantor IN, Ritacco V (2006) An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet Microbiol **112**, 111-118.
- de la Rua-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) **86**, 77-109.
- De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G (2006) Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiology Reviews **30**, 36-52.
- De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Aínsa JA, Gugliera P, Riccardi G (2002) The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Med **8**, 714-724.
- Devasia R, Blackman A, Eden S, Li H, Maruri F, Shintani A, Alexander C, Kaiga A, Stratton CW, Warkentin J, Tang Y-W, Sterling TR (2012) High Proportion of Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Novel Gyrase Polymorphisms and a *gyrA* Region Associated with Fluoroquinolone Susceptibility. Journal of Clinical Microbiology **50**, 1390-1396.
- Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Asiimwe BB, Mayanja HK, Okwera A, Whalen C, Joloba ML (2010) Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. BMC Infect Dis **10**, 349.
- Dinesh N, Sharma S, Balganes M (2013) Involvement of efflux pumps in the resistance to peptidoglycan synthesis inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother **57**, 1941-1943.
- Domenech P, Reed MB, Barry CE (2005) Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drugresistance. Infect. Immun **73**, 3492-3501.
- Drlica K, Malik M (2003) Fluoroquinolones: action and resistance. Curr Top Med Chem **3**, 249-282.
- Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, Venter H, Chiu W, Luisi BF (2014) Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. Nature **509**, 512-515.

- Dubarry J, Álvarez, A. R., Errea, A. María, A. Vera, O., Vespól, I, Pucheu, V, Galeano, M. F. (2004) Actinobacilosis y Actinomycosis: una causa frecuente de lesiones granulomatosas en los bovinos del departamento de Maracó, provincia de La Pampa, República Argentina. Ciencia Veterinaria **6**, 35-41.
- Economou V, Gousia PA (2015) Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infect Drug Resist. **8**, 49-61.
- Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Ritacco V, Balloux F (2015) Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. Nature Communications **6**, 7119.
- Esteban J, Robles P, Soledad Jiménez M, Fernández Guerrero ML (2005) Pleuropulmonary infections caused by *Mycobacterium bovis*: a re-emerging disease. Clin Microbiol Infect **11**, 840-843.
- Estrada Chávez C, Mancilla R, Arriaga Díaz C, Perez Gonzalez R, Díaz Otero F (2001) Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. Veterinaria México **32**, 2007-2011.
- Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P (2007) Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. The Lancet **369**, 1270-1276.
- Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jaton K, Pfyffer GE, Borrell S, Dubuis O, Bruderer T, Siegrist HH, Furrer H, Calmy A, Fehr J, Stalder JM, Ninet B, Böttger EC, Gagneux S, for the Swiss HIVCS, the Swiss Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study G (2012) Effect of Mutation and Genetic Background on Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**, 3047-3053.
- Fetene T, Kebede N, Alem G (2011) Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Ethiopia. Zoonoses Public Health **58**, 47-53.
- Feuerriegel S, Koser CU, Richter E, Niemann S (2013) *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. J Antimicrob Chemother. J Antimicrob Chemother **68**, 1439-1445.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR, Venter JC, Fraser CM (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol **184**, 5479-5490.
- Flores Popoca EO, Mendoza Medellín, A., Sandoval Trujillo, H., Quiñones Falconi, F., Ramírez Durán, N. (2011) Presencia de *Mycobacterium spp.* en hatos lecheros del estado de México. Nota Técnica. Revista Científica **21**, 39-42.
- Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, Korber B, Fortune S (2012) *Mycobacterium tuberculosis*--heterogeneity revealed through whole genome sequencing. Tuberculosis (Edinb) **92**, 194-201.

- Ford CB, Lin PL, Chase M, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, Ioerger TR, Sacchettini JC, Lipsitch M, Flynn JL, Fortune SM (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. Nature genetics **43**, 482-486.
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y (2009) Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. Genome Res **19**, 521-532.
- Gagneux S (2009) Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect **15 Suppl 1**, 66-68.
- Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Muñoz S, Hopewell PC, Small PM, Pym AS (2006a) Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog **2**, e61.
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM (2006b) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A **103**, 2869-2873.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannon BJ (2006c) The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Science **312**, 1944-1946.
- García CL, Milian, S. F, Anaya, E.A.M. (2005) Situación de la tuberculosis bovina en México 1990-2004. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. pp.
- García Ortiz RA (2013) Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en Baja California. Universidad Autónoma de Baja California. pp.
- García-Ramos R, F.L L-L, Túnez-Bastida V, Pérez Del Molino-Bernal ML, Cabarcos Ortiz de Barrón A (2003) Tratamiento actual de la tuberculosis. Anales de Medicina Interna **20**, 43-52.
- Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJM, Brinkman FSL, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. New England Journal of Medicine **364**, 730-739.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**, 7877-7882.
- Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC (2012) Evaluation of Genetic Mutations Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Amikacin, Kanamycin and Capreomycin: A Systematic Review. PLoS ONE **7**, e33275.
- Glaser L, Carstensen M, Shaw S, Robbe-Austerman S, Wunschmann A, Grear D, Stuber T, Thomsen B (2016) Descriptive Epidemiology and Whole Genome Sequencing

- Analysis for an Outbreak of Bovine Tuberculosis in Beef Cattle and White-Tailed Deer in Northwestern Minnesota. *PLOS ONE* **11**, e0145735.
- Gordon SV, Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S. T. (1999) New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. *Microbiology* **145**, 881-892.
- Grange JM (2001) *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* **81**, 71-77.
- Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, Sharma VD, (2010) Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb. Drug Resist* **16**, 21-28.
- Gutiérrez Reyes JA, García Casanova L, Romero Torres C, Sosa Gallegos SL, Cantó Alarcón GJ, Mercado Pezzat M, Pizano Martínez O, Estrada Chávez C, Milián Suazo F (2012) Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* **106**, 1-8.
- Hawkey PM, Smith, E. G., Evans, J. T., Monk, P., Bryan, G., Mohamed, H. H., Bardhan, M., Pugh, R. N. (2003) Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to *IS6110*-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3514-3520.
- Hermoso de Mendoza SM (1992) Tuberculosis bovina, tratado de veterinaria. 35-42 pp.
- Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, LoBue PA (2008) Human Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995–2005. *Clin Infect Dis* **47**, 168-175.
- Horner DS, Pavesi, G., Castrignano, T., De Meo, P., Liuni, S., I Sammeth, M., Picardi, E., Pesole, G. (2010) Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*. **2**, 181-197.
- Huard RC, de Oliveira Lazzarini, L. C., Butler, W. R., van Soolingen, D., Ho, J. L. (2003) PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis Complex* on the Basis of Genomic Deletions. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1637-1650.
- Humblet MF, Gilbert M, Govaerts M, Fauville-Dufaux M, Walravens K, Saegerman C (2010) New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 2802-2808.
- Hutchings MR, Harris S (1997) Effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *Vet J* **153**, 149-162.
- Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J (2014) Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *BioMed Research International* **2014**, 645802.
- Javed MT, Aranaz A, de Juan L, Bezos J, Romero B, Alvarez J, Lozano C, Mateos A, Domínguez L (2007) Improvement of spoligotyping with additional spacer

- sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. Tuberculosis (Edinb) **87**, 437-445.
- Jawetz E, Melnick, J., y Abelberg, A. (2013) *Microbiología Médica*. México. p.
- Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, Wang H (2008) Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. Microb. Drug Resist **14**, 7-11.
- Johansen S, Maus C, Plikaytis B (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'- O-methylations in 16S and 23S rRNAs. Mol Cell **23**, 173-182.
- Kamath PL, Foster JT, Drees KP, Luikart G, Quance C, Anderson NJ, Clarke PR, Cole EK, Drew ML, Edwards WH, Rhyan JC, Treanor JJ, Wallen RL, White PJ, Robbe-Austerman S, Cross PC (2016) Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. Nature Communications **7**, 11448.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology **35**, 907-914.
- Kamerbeek J, Schouls L., Kolk A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw R., Goyal, M., van Embden, J. (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology **35**, 907-914.
- Kao R, Price-Carter M, S. R-A (2016) Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. Revue scientifique et technique **35**, 241-258.
- Kazwala RR, Kambarage DM, Daborn CJ, Nyange J, Jiwa SF, Sharp JM (2001) Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania. Vet Res Commun **25**, 609-614.
- Kocagöz T, Hackbarth CJ, Unsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF (1996) Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis H37RV*. Antimicrob Agents Chemother **40**, 1768-1774.
- Kocagoz T, Saribas Z, Alp A (2005) Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J Clin Microbiol **43**, 6015-6019.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD (1999) Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis complex* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. Journal of Clinical Microbiology **37**, 2607-2618.
- Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S (2003) *Mycobacterium bovis subsp. caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J Clin Microbiol **41**, 3070-3077.

- Kwara A, Schiro, R., Cowan, L. S., Hyslop, N. E., Wiser, M. F., Roahen, H. S., Kissinger, P., Diem, L., Crawford, J.T. (2003) Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Journal of Clinical Microbiology **41**, 2683-2685.
- Laniado-Laborín R, Muñoz-Salazar R, García-Ortiz RA, Vargas-Ojeda AC, Villa-Rosas C, Oceguera-Palao L (2014) Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. Infection, Genetics and Evolution **27**, 1-5.
- Lanzas F, Karakousis PC, Sacchetti JC, Ioerger TR (2013) Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama Is Driven by Clonal Expansion of a Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Related to the KZN Extensively Drug-Resistant M. tuberculosis Strain from South Africa. Journal of Clinical Microbiology. **51**, 3277-3285.
- Lau RWT, Ho P-L, Kao RYT, Yew W-W, Lau TCK, Cheng VCC, Yuen K-Y, Tsui SKW, Chen X, Yam W-C (2011) Molecular Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Analysis of *gyrA* Mutation at Position 74. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**, 608-614.
- Lee AS, Tang LL, Lim IH, Bellamy R, Wong SY (2002a) Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. J Clin Microbiol **40**, 657-659.
- Lee AS, Tang LL, Lim IH, Wong SY (2002b) Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **6**, 48-51.
- Lee RS, Radomski N, Proulx J-F, Manry J, McIntosh F, Desjardins F, Soualhine H, Domenech P, Reed MB, Menzies D, Behr MA (2015) Reemergence and Amplification of Tuberculosis in the Canadian Arctic. The Journal of Infectious Diseases **211**, 1905-1914.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics **25**, 2078-2079.
- LoBue PA, Moser KS (2005) Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **9**, 333-338.
- Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramirez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Samper S, Gonzalez-y-Merchand JA (2010) First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. BMC Microbiol **10**, 82.
- López-Rocha E, Juárez-Álvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernández-Nieto J, Enciso-Moreno JA, López-Revilla R (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México. BMC Research Notes **6**, 172.
- Lopez-Valencia G, Renteria-Evangelista T, Williams JeJ, Licea-Navarro A, Mora-Valle AeL, Medina-Basulto G (2010) Field evaluation of the protective efficacy of

- Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science **88**, 44-49.
- Louw TM, Booth CS, Pienaar E, Termaat JR, Whitney SE, Viljoen HJ (2011) Experimental Validation of a Fundamental Model for PCR Efficiency. Chem Eng Sci **66**, 1783-1789.
- Lüchter F (2004) Introducción al estudio de las enfermedades infecciosas. En: Enfermedades infecciosas de los rumiantes. Buenos Aires, Argentina. 123-131 p.
- Luo T, Yang C, Peng Y, Lu L, Sun G, Wu J, Jin X, Hong J, Li F, Mei J, DeRiemer K, Gao Q (2014) Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) **94**, 434-440.
- M. de Vos, Müller B, Borrell S, Black PA, van Helden PD, Warren RM, Gagneux S (2013) Putative Compensatory Mutations in the *rpoC* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Are Associated with Ongoing Transmission. Antimicrob Agents Chemother **57**, 827-832.
- Mandal S, Bradshaw, L., Anderson, L. F., Brown, T., Evans, J. T., Drobniowski, F., Smith, G., Magee, J. G., Barrett, A., Blatchford, O., Laurensen, I. F., Seagar, A. L., Ruddy, M., White, P. L., Myers, R., Hawkey, P., Abubakar. I. (2011) Investigating Transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. Jornal of Clinical Microbiology **49**, 1943-1950.
- Marcos JY, Soriano AC, Salazar MS, Moral CH, Ramos SS, Smeltzer MS, Carrasco GN (1999) Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. J Clin Microbiol **37**, 570-574.
- Marcos JY, Soriano, A. C., Salazar, M. S., et al.. (1999) Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *aroA* Gene. Journal of Clinical Microbiology **37**, 570-574.
- Martínez-Vidal C, Hori-Oshima S, De la Mora-Valle A, Bermúdez-Hurtado RM, Rentería-Evangelista TB, López-Valencia G, Galván-Lara LJ, Medina-Basulto GE (2011) VNTR for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle slaughtered in Baja California, Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias **2**, 393-401.
- Mawak J, Gomwalk, N., Bello, C., Kandakai-Olukemi, Y. (2006) Human pulmonary infections with bovine and environment (atypical) mycobacteria in Jos, Nigeria. Ghana Medical Journal **40**, 132-136.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P (2001) High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci U S A **98**, 1901-1906.
- Mehaffy C, Guthrie JL, Alexander DC, Stuart R, Rea E, Jamieson FB (2014) Marked Microevolution of a Unique *Mycobacterium tuberculosis* Strain in 17 Years of Ongoing Transmission in a High Risk Population. PLoS ONE **9**, e112928.

- Menzies FDN, S. D. (2000) Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. The Veterinary Journal **160**, 92-106.
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet **11**, 31-46.
- Mfinanga SG, Morkve O, Kazwala RR, Cleaveland S, Sharp MJ, Kunda J, Nilsen R (2004) Mycobacterial adenitis: role of *Mycobacterium bovis*, non-tuberculous mycobacteria, HIV infection, and risk factors in Arusha, Tanzania. East Afr Med J **81**, 171-178.
- Milián F, Sánchez LM, Toledo P, Ramírez C, Santillán MA (2000) Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. Rev Latinoam Microbiol **42**, 13-19.
- Milián-Suazo F, Banda-Ruíz V, Ramírez-Casillas C, Arriaga-Díaz C (2002) Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. Preventive Veterinary Medicine **55**, 255-264.
- Milian-Suazo F, Garcia-Casanova L, Robbe-Austerman S, Canto-Alarcon GJ, Barcenas-Reyes I, Stuber T, Rodriguez-Hernandez E, Flores-Villalva S (2016) Molecular Relationship between Strains of *M. bovis* from Mexico and Those from Countries with Free Trade of Cattle with Mexico. PLOS ONE **11**, e0155207.
- Milián-Suazo F, García-Casanova L, Romero-Torres C, Canto-Alarcon JG, Gutiérrez-Reyes JA, Gallegos -Sosa S, Mercado-Pezzat M, Mejía-Estrada F, Peña-Cisneros AL, Estrada-Chávez C, Pizano-Martínez O (2012) Genetic diversity and geographic distribution of *Mycobacterium bovis* from cattle in Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias **3**, 459-471.
- Milián-Suazo F, Pérez-Guerrero L, Arriaga-Díaz C, Escartín-Chávez M (2010) Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. Preventive Veterinary Medicine **97**, 37-44.
- Milian-Suazo F, Salman MD, Ramirez C, Payeur JB, Rhyan JC, Santillan M (2000) Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. American Journal of Veterinary Research **61**, 86-89.
- Mishra A, Singhal A, Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, Bharadwaj SS, Sreenivas V, Prasad HK (2005) Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. J Clin Microbiol **43**, 5670-5678.
- Mitarai S, Kato S, Ogata H, Aono A, Chikamatsu K, Mizuno K, Toyota E, Sejimo A, Suzuki K, Yoshida S, Saito T, Moriya A, Fujita A, Sato S, Matsumoto T, Ano H, Suetake T, Kondo Y, Kirikae T, Mori T (2012) Comprehensive Multicenter Evaluation of a New Line Probe Assay Kit for Identification of *Mycobacterium* Species and Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology **50**, 884-890.
- Morales A, Irma, M., Adriana, C., Álvarez, G., Álvarez, M., Maldonado, J. (2005) Comparación de histopatología, cultivo y pcr en el diagnóstico de tuberculosis bovina. Revista Científica **15**, 103-108.
- Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R (1994) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol **40**, 153-177.

- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA (2002) Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis complex*. J Infect Dis **186**, 74-80.
- Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laise CJ, Parsons SD, van Helden PD, Zinsstag J (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. Emerging Infectious Diseases **19**, 899-908.
- Murphree R, Warkentin, J.V., Dunn, J.R., Schaffner, W. & Jones, T.F. (2011) Elephant-to-human transmission of tuberculosis. Emerging Infectious Disease **7**, 366-371.
- Neill SD, Pollock, J. M., Bryson, D. B. & Hanna, J. (1994) Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. . Veterinary Microbiology **40**, 41-52.
- Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Maraki S, Spandidos DA (2007) Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **26**, 151-152.
- Niemann S, Richter, E., Rüsç-Gerdes, S. (2000a) Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis Complex* by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. Journal of Clinical Microbiology **38**, 152-157.
- Niemann SH, D., Rüsç-Gerdes, S., Richter E. (2000b) Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis Complex* Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. Journal of Clinical Microbiology **38**, 3231-3234.
- NOM-024-ZOO- (1995) Norma Oficial Mexicana. pp.
- NOM-031-ZOO- (1995) Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). pp.
- NOM-051-ZOO (1995) Norma Oficial Mexicana pp.
- Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsç-Gerdes S, Loch C, Niemann S, Supply P (2007) Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. J Clin Microbiol **45**, 691-697.
- OIE (2012) Tuberculosis Bovina. Manual Terrestres de la OIE pp.
- Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuk iY, Ochi K (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. Molecular Microbiology **63**, 1096-1106.
- OPS (2008) Manual para el Diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. pp.
- Ortiz Muñoz EP (2015) La Tuberculosis Bovina: un problema aún sin resolver. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias **4**, 339.
- Padilla-Campos IF, Segura-Correa, J. C., Rodríguez-Buenfil, J. C., Morales-Loredo, A., Álvarez- Ojeda, G. (2011) MOLECULAR PATTERN OF *Mycobacterium bovis* ISOLATES AND ITS RELATIONSHIP WITH RISK FACTORS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF BOVINE TUBERCULOSIS IN NORTHERN MEXICO. Tropical and Subtropical Agroecosystems **14**, 465-471.

- Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y (2013) Study of the Rifampin Monoresistance Mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**, 893-900.
- Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M (2008) [Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico]. Salud Pública de México **50**, 286-291.
- Pérez-Lago L, Navarro Y, García-de-Viedma D (2014) Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. Research in Veterinary Science **97 Suppl**, S94-S100.
- Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van Soolingen D (1998) *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerging Infectious Diseases **4**, 631-634.
- Pitaksajakul P, Wongwit W, Punprasit W, Eampokalap B, Peacock S, P. R (2005) Mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health **36**, 228-237.
- Portillo-Gómez L, Sosa-Iglesias EG (2011) Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **15**, 1409-1414.
- Prasad HK, Singhal A, Mishra A, Shah NP, Katoch VM, Thakral SS, Singh DV, Chumber S, Bal S, Aggarwal S, Padma MV, Kumar S, Singh MK, Acharya SK (2005) Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. Tuberculosis (Edinb) **85**, 421-428.
- Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W (2002) Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis subsp. caprae* in western Austria. J Clin Microbiol **40**, 2270-2272.
- Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G (2001) Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* Revista de Diagnóstico Biológico **50**.
- Ramaswamy SV, Reich R, Dou S-J, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA (2003) Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**, 1241-1250.
- Richter BG, Sexton DP (2009) Managing and analyzing next-generation sequence data. PLoS Comput Biol **5**, e1000369.
- Ritacco V, López B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A (1991) Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Res Vet Sci **50**, 365-367.
- Rivero A, Márquez M, Santos J, Pinedo A, Sánchez MA, Esteve A, Samper S, Martín C (2001) High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. Clinical Infectious Diseases **32**, 159-161.
- Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011) Integrative genomics viewer. Nat Biotech **29**, 24-26.

- Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, Herrera L, Jiménez MS, Samper S, Iglesias MJ (2009) Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. Int J Tuberc Lung Dis **13**, 1536-1541.
- Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein RS (2010) Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. International Journal of Infectious Diseases **14 Suppl 3**, e129-135.
- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA (2008) Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. Emerg Infect Dis **14**, 909-916.
- Romero B, Rodríguez S, Bezos J, Díaz R, Copano MF, Merediz I, Mínguez O, Marqués S, Palacios JJ, García de Viedma D, Sáez JL, Mateos A, Aranaz A, Domínguez L, de Juan L (2011) Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. Emerg Infect Dis **17**, 2393-2395.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR (1990) A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust Vet J **67**, 134-137.
- SAGARPA (1995a) NOM-024-ZOO-1995. Especificaciones y características zoosanitarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. pp.
- SAGARPA (1995b) NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). pp.
- SAGARPA (1995c) Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales. pp.
- SAGARPA (2005) Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017- ZOO-2005. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). pp.
- SAGARPA (2011a) Informe de Evaluación de Avances logrados entre 2006 y 2010. Campaña contra la Tuberculosis Bovina pp.
- SAGARPA (2011b) Evaluación Estatal de avances logrados entre 2006 y 2010 Campaña contra la Tuberculosis Bovina. pp.
- Said Fernández S, Becerril Montes P, Molina Salinas GM, Barrios García H, Vargas Villarreal J (2005) Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. Enfermedades Emergentes **7**, 13-19.
- Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gómez LI, Lafoz MC, Jiménez MS, Ortega A, Lezcano MA, Van Soolingen D, Martín C, MDR-TB SWGo (2005) Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates from Spain. J Clin Microbiol **43**, 1220-1227.
- Santillan-Flores MA, Flores J, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Suárez-Güemes F, Espitia C (2006) Polymorphism of the PE domain of PE/PE_PGRS sequences in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in Mexico. Veterinary Microbiology **115**, 364-369.
- Schürch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, van Soolingen D (2010) High-Resolution Typing by Integration of Genome Sequencing Data in a Large Tuberculosis Cluster. Journal of Clinical Microbiology **48**, 3403-3406.

- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y (1997) Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother **41**, 540-543.
- Scorpio A, Zhang Y (1996) Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med **2**, 662-667.
- Scorpio AZ, Y. (1996) Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nature Medicine **2**, 662-667.
- Sechi LA, Zanetti S, Sanguinetti M, Molicotti P, Romano L, Leori G, Delogu G, Boccia S, La Sorda M, Fadda G (2001) Molecular Basis of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Sardinia, Italy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**, 1645-1648.
- Secretaria de Salud México (2015) Misión de evaluación externa del programa de control de la tuberculosis. pp.
- SENASICA (2011a) MANUAL DE INSPECCIÓN SANITARIA PARA GANADOVACUNO SOSPECHOSO DETUBERCULOSIS BOVINA. 1-51 pp.
- SENASICA (2011b) Manual de inspección sanitaria para ganado bovino sospechoso a tuberculosis bovina. pp.
- Seung KJ, Gelmanova IE, Peremitin GG, Golubchikova VT, Pavlova VE, Sirotkina OB, Yanova GV, Strelis AK (2004) The effect of initial drug resistance on treatment response and acquired drug resistance during standardized short-course chemotherapy for tuberculosis. Clin Infect Dis **39**, 1321-1328.
- Shi J, Wang Z, Wang P, Jin W (2011) [Application and comparison of allograft and autograft bone for interbody fusion in cervical tuberculosis]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **25**, 1290-1293.
- Shitaye JE, Tsegaye, W., Pavlik, I. (2007) Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia: A review. Vererinary Medicine **52**, 317-332.
- Siu G, Yam W, Zhang Y, Kao R (2014) An upstream truncation of the *furA-katG* operon confers high-level isoniazid resistance in a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate with no known resistance-associated mutations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **5**, 6093-6100.
- Smith NH, Upton P (2012) Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; <http://www.Mbovis.org>. Infection, Genetics and Evolution **12**, 873-876.
- Spies FS, Almeida da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A (2008) Identification of Mutations Related to Streptomycin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and Possible Involvement of Efflux Mechanism. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **52**, 2947-2949.
- Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM (1997a) Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob Agents Chemother **41**, 636-640.

- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Telenti A, Musser JM (1997c) Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. Antimicrob Agents Chemother **41**, 1677-1681.
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics **30**, 1312-1313.
- Stein LD (2010) The case for cloud computing in genome informatics. Genome Biol **11**, 207.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **44**, 4498-4510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C (2001) Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol **39**, 3563-3571.
- Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, Majlessi L, Criscuolo A, Tap J, Pawlik A, Fiette L, Orgeur M, Fabre M, Parmentier C, Frigui W, Simeone R, Boritsch EC, Debrie A-S, Willery E, Walker D, Quail MA, Ma L, Bouchier C, Salvignol G, Sayes F, Cascioferro A, Seemann T, Barbe V, Locht C, Gutierrez M-C, Leclerc C, Bentley SD, Stinear TP, Brisse S, Medigue C, Parkhill J, Cruveiller S, Brosch R (2013) Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet **45**, 172-179.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C (2000) Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol **36**, 762-771.
- Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, Taniguchi H (1998) Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology **36**, 1220-1225.
- Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, M Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WRJ, Telenti A (1994) Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38**, 773-780.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution **30**, 2725-2729.
- Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, Chen J, Yang F, Zhang K, Tan S, Zhao Y (2014) Role of *pncA* and *rpsA* Gene Sequencing in Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. Journal of Clinical Microbiology **52**, 291-297.

- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WRJ (1997) The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nature Medicine **3**, 567-570.
- Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC (2012) Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. Indian J Microbiol **52**, 289-291.
- Thoen C, Lobue P, de Kantor I (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol **112**, 339-345.
- Tizard IR (2004) Veterinary Immunology. Michigan. U.S.A. p.
- Torgerson PR (2010) Cost-effectiveness of bovine TB control. Vet Rec **167**, 540.
- Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A, Ponce de Leon-Garduño A, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-Del-Valle M (2013) Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLOS Neglected Tropical Diseases **7**, e2177.
- Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S (2014) Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy. Drugs **74**, 1063-1072.
- Vazquez-Chacon CA, Martínez-Guarneros A, Couvin D, González-Y-Merchand JA, Rivera-Gutierrez S, Escobar-Gutierrez A, De-la-Cruz López JJ, Gomez-Bustamante A, Gonzalez-Macal GA, Gonçalves Rossi LM, Muñoz-Salazar R, Rastogi N, Vaughan G (2015) Human multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* infection in Mexico. Tuberculosis **95**, 802-809.
- Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Elias CDO, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ (2015) Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. The Lancet Infectious Diseases **15**, 1193-1202.
- Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW (1995) Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol **43**, 227-240.
- Wood PR, Rothel JS, McWaters PG, Jones SL (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. Vet Immunol Immunopathol **25**, 37-46.
- Wozniak M, Tiuryn J, Wong L (2014) GWAMAR: Genome-wide assessment of mutations associated with drug resistance in bacteria. BMC Genomics **15**, S10-S10.
- Xia E, Teo YY, Ong RT (2016) SpoTyping: fast and accurate in silico *Mycobacterium* spoligotyping from sequence reads. Genome Medicine **8**, 19.
- Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirola ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C (2010) *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. Journal of Medical Microbiology **59**, 285-294.
- Zhang Y, Mitchison D (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis **7**, 6-21.

- Zhang Y, Yew WW (2009) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis **13**, 1320-1330.
- Zhang Y, Yew WW (2015) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. Int J Tuberc Lung Dis **19**, 1276-1289.
- Zink AR, Nerlich AG (2004) Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis complex* in archival tissue samples. J Clin Pathol **57**, 1185-1192.
- Zumárraga M, Bigi, F., Alito, A., Romano, M. I., Cataldi, A. (1999) A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology **145**, 893-897.
- Zumárraga MJ, Arriaga C, Barandiaran S, Cobos-Marín L, de Waard J, Estrada-García I, Figueiredo T, Figueroa A, Giménez F, Gomes HM, Gonzalez-Y-Merchand JA, Macías A, Milián-Suazo F, Rodríguez CA, Santillán MA, Suffys PN, Trangoni MD, Zárraga AM, Cataldi A (2013) Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. Research in Veterinary Science **94**, 9-21.