

2019 Diversidad Genética de *M. bovis* del ganado en México y
Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) asociado a resistencia
natural a la Tuberculosis.

MSPAS. Sara González Ruiz



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**Diversidad Genética de *M. bovis* del ganado en México y
Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) Asociado a Resistencia
Natural a la Tuberculosis.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Presenta:

MSPAS. Sara González Ruiz

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo

Co-Director:

Dr. Sergio Iván Román Ponce

Querétaro, Qro. Septiembre, 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Diversidad Genética de *M. bovis* del Ganado en México y Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) Asociado a Resistencia Natural a la Tuberculosis.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Presenta:

MSPAS. Sara González Ruiz

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo

Co: dirigido por:

Dr. Sergio Iván Román Ponce

Dr. Feliciano Milián Suazo
Presidente

Dr. Sergio Iván Román Ponce
Secretario

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez
Suplente

Dra. Marina Durán Aguilar

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
29 de agosto de 2019
México

DEDICATORIAS

*A mi hijo: **Uriel Arturo***

Por su amor y sus palabras de aliento, por esos abrazos y besos, por estar en mi vida y llenarme de orgullo al ser tu mami. Te Amo Mucho Piquirilo, gracias por tanto y por todo.

*A mis padres: **Sara y Arturo***

Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como en la vida, por su apoyo incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ustedes. Esto es para ustedes y por ustedes!!!

A mi familia

Por su aliento y apoyo durante estos años, por compartir momentos graciosos llenos de risas y cariño.

*A mis queridas amigas: **Diana, Osiris, Pau y Fernanda***

Porque sin sus locuras no hubiera logrado este paso importante, por su compañía en las noches frías, pero también en los momentos alegres, por sus cálidos abrazos y su apoyo.

*A mi querida amiga: **Isabel***

Por acompañarme en esta travesía, por brindarme esas palabras de aliento cuando no podía más, por aguantarme cuando salíamos de viaje y yo quería quedarme en el cuarto de hotel (jaja). P.D. Acuérdate de Acapulco... te perdono la ahogada.

*A mis profesores favoritos: **Dr. Feliciano y Dr. Cantó***

Solo puedo decirles: ¡Gracias! por su apoyo, sus consejos, conocimientos, dirección, enseñanza, cada una de estas páginas es por ustedes y para ustedes. P.D. Arriba el América! (jaja).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca recibida durante mis estudios de doctorado, así como para los apoyos para estancias y congresos.

Mi profundo agradecimiento a mi amigo y tutor de tesis Dr. Feliciano Milián Suazo por su amistad, instrucción y colaboración durante el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Sergio I. Román Ponce le agradezco su dedicación y valiosos aportes durante mis estudios en la realización de esta tesis.

Al resto de los miembros del jurado, por sus aportaciones, correcciones, tiempo y apoyo para que este proyecto saliera adelante. Dr. Germinal J. Cantó Alarcón, Dra. Marina Durán Aguilar y Dra. Sara E. Herrera Rodríguez.

Al Dr. Alessandro y Dra. Pia, mi más profundo agradecimiento por su apoyo, tiempo y solidaridad para el análisis de datos de la investigación y por la estadía más linda que he tenido en Italia.

A la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ por permitirme realizar mis estudios de doctorado y por los apoyos brindados durante este.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Historia de la tuberculosis	9
2.2 Características del género <i>Mycobacterium</i>	10
2.3 <i>Mycobacterium bovis</i>	10
2.4 Diagnóstico de Tuberculosis bovina (TBb)	12
2.5 Genotipificación del patógeno: <i>Spoligotyping</i>	13
2.6 Genotipificación del huésped	13
2.7 Genes asociados a resistencia	15
2.8 Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP)	15
2.9 Controles de calidad de SNP	19
III. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Específicos	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 EXPERIMENTO 1	21
4.1.1 Aislados de <i>M. bovis</i>	21
4.1.2 ADN para <i>spoligotyping</i>	21
4.1.3 Espoligotipificación	21
4.1.4 Análisis filogenético	22
4.2 EXPERIMENTO 2	22
4.2.1 Muestras biológicas	22
4.2.2 Análisis bacteriológico	23

4.2.3	Diseño experimental, extracción de ADN, agrupación y genotipado -----	23
4.2.4	Análisis estadístico del agrupamiento de ADN-----	25
4.2.5	Definición de región de loci de rasgos cuantitativos (QTLR) -----	26
4.2.6	Anotación funcional del QTLR -----	27
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	28
5.1	EXPERIMENTO 1 -----	28
5.2	EXPERIMENTO 2 -----	35
VI.	CONCLUSIONES -----	43
VII.	LITERATURA CITADA -----	44
VIII.	APÉNDICES -----	57
8.1	QTLRs identificados en Chrs y en Chrx, y la lista completa de todos los genes mapeados dentro de los QTLR. Las regiones destacadas y resaltadas son aquellas que se encuentran por encima del 5% de los umbrales de PFP y del 1% de PFP. -----	57
8.2	Artículo 1. Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión -----	61
8.3	Artículo 2. Genetic diversity of <i>Mycobacterium bovis</i> in Jalisco, Mexico: Tracing back sources of infection-----	78
8.4.	Artículo 3. Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis. -----	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
1	Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) asociado a existencia y/o susceptibilidad a Tuberculosis bovina.	18
2	Esquema de agrupaciones para casos (CA), controles (CT) y genotipado.	25
3	Espoligotipos más frecuentes de <i>M. bovis</i> en Jalisco y el resto del país por función zootécnica.	28
4	Resultados del análisis de GO y de la ruta (KEGG) para todos los genes incluidos en QTLR significativos.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Vías de transmisión intra y entre especies de <i>Mycobacterium bovis</i> .	11
2	Ganglios linfáticos retrofaríngeos con lesiones visible de TBb (A). Colonias de <i>M. bovis</i> en medios Stonebrink (B).	23
3	Árbol filogenético de aislados de <i>M. bovis</i> en el estado de Jalisco.	29
4	Spoligoforest de <i>M. bovis</i> , espoligotipos obtenidos en Jalisco, México.	31
5	Relación filogenética de los espoligotipos de <i>M. bovis</i> obtenidos en Jalisco y en el resto del país.	32
6	Manhattan plott para todos los cromosomas al PFP 10%, 5% y 1%.	36
7	Rede genéticas en el ganado bovino entre los QTLR identificadas al PFP 10%.	38

RESUMEN

Más de 100 años han transcurrido desde que *Mycobacterium tuberculosis* fue aislado por primera vez por Robert Koch, quien aisló *Mycobacterium bovis*, el patógeno del ganado y diversas especies animales. La tuberculosis bovina (TBb) ocasionada por *M. bovis* es una enfermedad infecto-contagiosa de relevancia en la salud pública y de repercusiones económicas para la industria ganadera. En la actualidad, existe una gran cantidad de herramientas moleculares capaces de identificar polimorfismos en el patógeno o en el huésped. *Spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*), es una técnica que se basa en la identificación de variaciones en los espacios inter de secuencias fijas llamadas “repeticiones directas” del genoma del bacilo. Esta técnica ha sido muy utilizada para determinar la distribución de cepas a nivel regional y para el rastreo epidemiológico de brotes. No obstante, en ocasiones es conveniente estudiar al hospedero para determinar características genotípicas que pudieran estar relacionadas con características fenotípicas de interés epidemiológico. En el presente estudio se obtuvieron 337 aislados del estado de Jalisco, y de estos se obtuvieron 59 espoligotipos. Los espoligotipos más frecuentes en Jalisco, también se reportaron en el resto del país (SB0673, SB0971, SB0669 y SB0140) sin embargo, debido a la falta de información y registros epidemiológicos no hay pruebas suficientes para determinar que el estado de Jalisco sea la fuente de infección para el resto del país. Por otro lado, se identificaron variantes genéticas asociadas con la resistencia a TB en el ganado lechero Holstein de México utilizando un enfoque de casos y controles con un diseño experimental de agrupamiento selectivo de ADN. Se identificaron un total de 154 QTLR al 10% de PFP, 42 al 5% de PFP y 5 al 1% de PFP que albergan 172 genes. En el Chr13, se identificaron cinco nuevas regiones QTL (QTLR_95, QTLR_96, QTLR_97, QTLR_98 y QTLR_99), las cuales albergan los genes *MACROD2* y *KIF16B* asociados en la resistencia a la TBb. Los resultados revelan nuevas regiones QTL ubicadas en Chr 1, 3, 5, 25 y 29, las cuales albergan genes relacionados con la respuesta inmune. Las regiones genómicas y los genes identificados con DNA pooling de casos y controles se asociaron significativamente resistentes a TBb.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, *Spoligotyping*, QTLR, SNP, resistencia.

ABSTRACT

More than 100 years have passed since *Mycobacterium tuberculosis* was isolated for the first time by Robert Koch, who isolated *Mycobacterium bovis*, the pathogen of cattle and various animal species. Bovine tuberculosis (bTB) caused by *M. bovis* is an infectious-contagious disease of relevance in public health and of economic repercussions for the livestock industry. Recently, there is a large number of molecular tools capable of identifying polymorphisms in the pathogen or in the host. Spoligotyping (*spacer oligonucleotide typing*), is a technique that is based on the identification of variations in inter spaces of fixed sequences called "direct repeats" of the bacillus genome. This technique has been widely used to determine the distribution of strains at the regional level and for the epidemiological tracking of outbreaks. However, sometimes it is convenient to study the host to determine genotypic characteristics that could be related to phenotypic characteristics of epidemiological interest. In the present study, 337 isolates were obtained from the state of Jalisco, and of these, 59 spoligotypes were obtained. The most frequent spoligotypes in Jalisco, were also reported in the rest of the country (SB0673, SB0971, SB0669 and SB0140) however, due to the lack of information and epidemiological records there is not enough evidence to determine that the state of Jalisco is the source of infection for the rest of the country. On the other hand, genetic variants associated with TB resistance were identified in Mexican Holstein dairy cattle using a case-control approach with an experimental design of selective DNA pooling. A total of 154 QTLR at 10% PFP, 42 at 5% PFP and 5 at 1% PFP that harbor 172 genes were identified. In BTA13, five new QTL regions (QTLR_95, QTLR_96, QTLR_97, QTLR_98 and QTLR_99) were identified, which harbor the associated *MACROD2* and *KIF16B* genes in bTB resistance. The results reveal new QTL regions located in BTA 1, 3, 5, 25 and 29, which harbor genes related to the immune response. The genomic regions and the genes identified with DNA pooling of cases and controls were significantly associated with bTB resistance.

Key words: Bovine tuberculosis, spoligotyping, QTLR, SNP, resistance.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que tiene gran importancia, tanto económica como de salud pública (Abalos y Retamal, 2004). El patógeno propio de los animales es una bacteria llamada *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), que guarda estrecha relación con las bacterias causantes de la tuberculosis humana y aviar. Aunque el ganado es considerado como el verdadero hospedador de *M. bovis*, la bacteria ha sido aislada en otras especies animales, domésticas y no domésticas, así como del hombre (Pérez-Guerrero *et al.*, 2008). En bovinos domésticos, la TBb forma “tubérculos” o granulomas en cualquier parte del cuerpo, especialmente en nódulos de la cabeza, cuello, tórax y pulmón (Corner, 1993; Phillips *et al.*, 2003). La TBb es un importante riesgo de salud pública por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, ya que entre el 30 y el 40% de la leche producida es vendida en forma de leche cruda, por ello se han implementado prácticas como la pasteurización de la leche para eliminar el agente etiológico; sin embargo, en muchas partes del mundo se sigue consumiendo leche cruda o quesos frescos procedente de vacas enfermas, aumentando así la prevalencia de la enfermedad (Pérez-Guerrero *et al.*, 2008).

En México existe una campaña nacional para el control y la erradicación de la TBb que se rige por la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. No obstante, la participación de los productores de leche, donde la prevalencia de la enfermedad es elevada ($\approx 16\%$), es muy pobre. Una de las razones es la baja sensibilidad y especificidad de la prueba de la tuberculina que incrementa la desconfianza del productor en el programa; además de la falta de programas de indemnización (Pérez-Guerrero *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2010) y la aplicación de cuarentenas a los hatos ganaderos. La tuberculosis causa grandes pérdidas económicas, directas e indirectas. Directas por la muerte de los animales, el decomiso de canales en rastro, el desecho prematuro o por bajas en la producción (Bawinek and Taylor, 1996), e indirectas por el desecho prematuro e involuntario de animales, la disminución en el avance genético del hato y los costos de los programas de control y erradicación. En la actualidad existe una gran cantidad de herramientas moleculares capaces de identificar polimorfismos ya sea en el patógeno o en el huésped, dentro de las herramientas más

utilizadas para la genotipificación del patógeno son: RAPD, RFLP, *Spoligotyping*, MIRU-VNTR (Milián *et al.*, 2010; Guilla *et al.*, 2013; Naderi *et al.*, 2016). La técnica llamada *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*), se basa en la identificación de variaciones en los espacios inter de secuencias fijas llamadas “repeticiones directas” en la secuencia de inserción comúnmente conocida como IS6110. Esta técnica es de mucha utilidad para la genotipificación cuando se busca determinar la distribución de cepas a nivel regional, y para el rastreo epidemiológico de brotes ya que su poder de discriminación es menor (Milián *et al.*, 2010). No obstante, en ocasiones es necesario estudiar al hospedero para determinar características genotípicas que pudieran estar relacionadas con características fenotípicas. Por lo que, para disminuir la prevalencia de TBb en los hatos se han planteado alternativas de control, tales como la vacunación (Milián *et al.*, 2010) y la selección de animales resistentes o menos susceptibles a enfermedades (Bermingham *et al.*, 2009; Brotherstone *et al.*, 2010; Finlay *et al.*, 2012; Le Roex *et al.*, 2013). Herramientas como la Genómica han permitido detectar variaciones en el ADN de un individuo a otro, y esta información ha ayudado en las evaluaciones genéticas del ganado lechero identificando estructuras moleculares asociadas a características productivas de un alto valor comercial del animal (Casas, 2005). El ADN, que almacena la información hereditaria, está compuesto por cuatro bases nitrogenadas, cuando se detectan diferencias en una sola de estas bases, se le conoce como Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*). La ubicación de estos SNP se puede asociar a genes relacionados a características importantes del individuo; una vez que se identifiquen, estos polimorfismos se evalúan de las secuencias de genes que pudieran tener efectos sobre parámetros productivos que se deseen obtener, resultando en parámetros genéticos más precisos (Negrini *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue es determinar la distribución espacio-temporal de las cepas de *M. bovis* en el estado de Jalisco y compararla con la distribución en el resto del país, e identificar variaciones genéticas implicadas en la susceptibilidad y/o resistencia a TBb en el ganado lechero que pudieran ayudar a la selección de animales con mayor resistencia a la enfermedad.

II. ANTECEDENTES

2.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis (Tb) es una de las enfermedades más antiguas de la historia de la humanidad, encontrando hallazgos en momias egipcias del año 3000 a.C., donde médicos antiguos la describían como una enfermedad de consunción con hemoptisis (Farga, 2004; Lugones *et al.*, 2007). También fue denominada por el médico griego Hipócrates, como “tisis”, refiriéndose a cavidades torácicas, afirmando que “de un tísico nace otro tísico”, aunado a la devastación que sufría el cuerpo con fiebres incurables y ulceraciones permanentes. A finales del siglo XVIII se desarrolla con el nombre de “La Gran Peste”, afectó al 25% de la población en Europa y ha ocasionado gran número de muertes a lo largo de la historia de la humanidad (Ledermann, 2003).

Durante el siglo XVII, el anatomista Franciscus Sylvius, es el primero en describir el tubérculo con su proceso de reblandecimiento, y afirma que “la tisis es la escrófula del pulmón”, es decir los procesos infecciosos que afectan los ganglios linfáticos; Manget en 1702, describe la forma miliar de la enfermedad, y el médico inglés Benjamín Martem, infiere que la Tuberculosis podría ser causada por “criaturas vivientes diminutas” (Ospina, 2001). En el año 1843, nace Roberto Koch, quien se dedica a la investigación científico-bacteriológica y, en su escrito “sobre la etiología de la Tuberculosis”, demuestra la existencia del *Mycobacterium tuberculosis* como agente causal de la tuberculosis en sus diferentes formas, así como la vía de transmisión, ya que planteaba que “si se inocula a un cobayo sano un cultivo de bacilos, la herida cierra y parece curarse en los primeros días; alrededor de 10 a 15 días después se produce un nódulo duro que se abre pronto y que da lugar a una ulceración que dura hasta la muerte del animal”. De igual manera a la tuberculina, proteína derivada del germen, se le atribuye un poder curativo, en la actualidad esta proteína es utilizada como elemento de estudio epidemiológico y de diagnóstico de la enfermedad, llamada PPD (Ospina, 2001; Lugones *et al.*, 2007).

2.2 Características del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, familia Mycobacteriaceae, su nombre deriva del prefijo latino Myco que significa cera (Dorrnsoro and Torroba, 2007). Una de las características particulares de éste género son los componentes en su estructura envolvente, que se conforman de macromoléculas (peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos) y lípidos, lo que le hace que las micobacterias que sean impermeables, (Draper, 1998; Boris *et al.*, 2000).

El género *Mycobacterium* incluye más de 120 especies de micobacterias, algunas saprófitas, patógenos oportunistas y/o estrictas del hombre y de los animales (Cantó and Olvera, 2013); son ácido-alcohol resistentes (BAAR), debido a que su pared celular contiene lípidos de alto peso molecular que las hace impermeables a los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden apreciar con claridad en la tinción de Gram. Son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, son resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes, al igual que a la desecación y la congelación; sin embargo, la luz ultravioleta y el calor las inactiva (Dorrnsoro and Torroba, 2007).

Dentro de las micobacterias de mayor importancia, tanto para la salud humana como la animal, se encuentran las del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que se dividen en: *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis en humanos, aunque también se le encuentra en animales (Milián *et al.*, 2010), y *Mycobacterium bovis*, causante de la tuberculosis en vacas. Entre las menos frecuentes se encuentran: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium canetti*.

2.3 *Mycobacterium bovis*

El causante de la tuberculosis bovina y de algunas especies silvestres, así como del hombre, es el *Mycobacterium bovis*. Es un bacilo Gram-positivo, ligeramente curvado y delgado (0.3-1 x 2.4 µm) que no forma esporas y no presenta flagelos; es decir, son inmóviles, no presentan cápsula, son microaerófilos y altamente susceptibles a la luz solar (Cantó and Olvera, 2013). Esta micobacteria tiene un alto potencial zoonótico ya que está altamente

relacionado genéticamente con *Mycobacterium tuberculosis*, el causante de la tuberculosis humana (Reilly and Daborn, 1995). Además de los bovinos, los principales huéspedes de *M. bovis* son: ciervos, bisontes, jabalíes, camellos, elefantes, zorro, coyote, lobo, perros, tigre y leones, entre muchos otros, lo que hace muy difícil su control y erradicación (Milián, 2013).

M. bovis es causante de pérdidas económicas importantes en la ganadería mundial, estimadas en más de 3000 millones de pesos anualmente, por las pérdidas que produce ya sea de carne o leche, además de los decomisos en rastro (Garnier, 2003). La tuberculosis bovina se caracteriza por producir granulomas principalmente en pulmones y nódulos linfáticos de varias especies animales y en el hombre (Acosta-Salinas *et al.*, 2009).

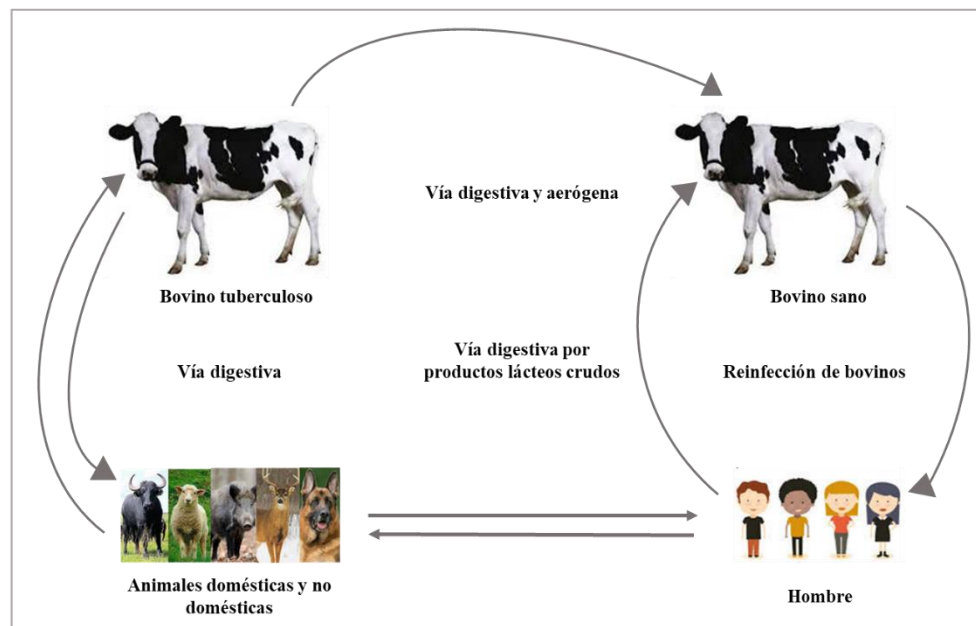


Figura 1. Vías de transmisión intra y entre especies de *Mycobacterium bovis*.

Dado que la infección por *M. bovis* es de curso crónico, puede tardar meses o incluso años hasta que el animal desarrolle la enfermedad, y los signos clínicos no son necesariamente específicos, los cuales incluyen: debilidad, anorexia, disnea, inflamación de ganglios linfáticos, tos, fiebre, puede haber pérdidas por abortos así como disminución en la producción láctea (Cardenal *et al.*, 1992). Las vías de transmisión de la tuberculosis bovina son variadas, la principal es respiratoria por inhalación de aerosoles contaminados, ingestión o por heridas en la piel. Se considera que al momento del sacrificio del animal, y dependiendo

de la ubicación de las lesiones, se deduce la vía de infección con *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003). A nivel de campo la mayoría de las lesiones se observan en el tracto respiratorio, principalmente en linfonodos; el 90% de los casos ocurren por vía respiratoria (Milián *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2010).

Las principales vías de secreción de *M. bovis* en el ganado bovino son las respiratorias, las heces, la leche, en orina y en algunas ocasiones en secreciones vaginales o el semen. (Zendejas *et al.*, 2007).

2.4 Diagnóstico de Tuberculosis bovina (TBb)

Para el diagnóstico rutinario de tuberculosis bovina en campo se utiliza la prueba intradérmica con derivado purificado preparado a partir de filtrados de cultivo de *Mycobacterium bovis* (PPD), también llamada tuberculina (prueba de hipersensibilidad retardada tipo IV). Esta prueba *in vivo* está establecida en la NOM-031-ZOO-1995 y tiene tres modalidades: aplicación en el pliegue caudal, utilizada en casos de alta prevalencia. Para casos de baja prevalencia se utiliza la cervical comparativa y la cervical simple. En el diagnóstico post-mortem se utiliza histopatología y el aislamiento bacteriológico a partir de lesiones (NOM-031-ZOO-1995; Estrada *et al.*, 2004). La tuberculina es elaborada a partir de *Mycobacterium bovis* cepa AN5. La PPD aviar se elabora a partir de *Mycobacterium avium* cepa D4. La prueba comparativa consiste en la aplicación intradérmica de los derivados proteicos puros, PPD bovino y PPD aviar, en animales a partir de los dos meses de edad; posterior a 72 horas de inoculación se obtienen los resultados, si se observa rubor, calor, dolor, necrosis o cualquier cambio mínimo en el sitio de aplicación, será indicativo de positivo (García, 2013).

Desafortunadamente la tuberculina no proporciona resultados confiables epidemiológicamente ya que tienen una sensibilidad que va del 40 al 70%, y una especificidad que va del 78 al 96%. Esto determina una alta proporción de falsos negativos y falsos positivos, por lo que muchos animales son erróneamente enviados a rastro, lo que reduce la confianza de los productores hacia los programas oficiales. Además de un costo extra para el productor por enviar animales falsos negativos a rastro (Milián *et al.*, 2010).

El desarrollo de nuevas herramientas en la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ha apoyado el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos y confiables para enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento (Díaz *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2005; García, 2013). Cuando los bacilos logran penetrar en los alveolos, estos son fagocitados por los macrófagos, que en conjunto con sus fagosomas son el lugar de eliminación y replicación de los bacilos causantes de tuberculosis. Para activar la respuesta inmune mediada por células, lo que pudiera resultar en un método de diagnóstico detectando IFN- γ en respuesta a un antígeno específico, es decir si un animal está infectado con *M. bovis*, tiene en la sangre linfocitos que reconocen antígenos micobacterianos presentes en el PPD, induciendo la secreción de IFN- γ para que pueda ser detectado por un ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos monoclonales (Rothel *et al.*, 1990; Hui-Qi Qu *et al.*, 2011).

2.5 Genotipificación del patógeno: *Spoligotyping*

En la actualidad existe una gran cantidad de herramientas moleculares capaces de identificar polimorfismos, ya sea en el patógeno o en el huésped, y es prácticamente imposible enumerarlos todos. Dentro de esta gama de herramientas, las más utilizadas son: RAPD, RFLP, Spoligotyping, MIRU-VNTR (Milián *et al.*, 2010; Guilla *et al.*, 2013; Naderi *et al.*, 2016). La técnica de Spoligotyping (spacer oligonucleotide typing), se basa en la identificación de variaciones en los espacios inter de secuencias fijas llamadas “repeticiones directas” en la secuencia de inserción comúnmente conocida como IS6110. Esta técnica es de mucha utilidad para la genotipificación cuando se busca determinar la distribución de cepas a nivel regional. (Milián *et al.*, 2010).

2.6 Genotipificación del huésped

Desde hace un tiempo en los diferentes sistemas de producción animal se ha vuelto indispensable el uso de programas de selección para la mejora de características económicamente importantes y para la producción animal. Existen herramientas como el mejoramiento genético, que es de gran utilidad, tanto para los criadores como para los productores, permitiendo obtener el valor genético de los animales para características

importantes, tales como: producción de leche, intervalo entre partos, pesos al destete y/o porcentaje de grasa, entre otras (Ángel-Marín *et al.*, 2013). Las características económicamente importantes para el mejoramiento genético son controladas por genes que generalmente son desconocidos, aunque se estima su localización aproximada en el genoma a través del uso de marcadores genéticos (Casas, 2005). Estos marcadores se han utilizado en la determinación de identidad genética y el parentesco de los animales (Heaton *et al.*, 2002).

En la actualidad, existen herramientas disponibles que permiten evaluar polimorfismos o marcadores genéticos a nivel de DNA desde estadios muy tempranos en el individuo. Lo que hace posible estudiar la composición genética de las poblaciones o individuos para cierta característica (Ángel-Marín *et al.*, 2013). Los estudios de genoma completo, incluyen la genotipificación de marcadores polimórficos en todo el genoma, por lo tanto, no tiene preferencia por genes específicos. Este procedimiento tiene la ventaja de que se pueden identificar otros genes que confieran resistencia, y no necesariamente estén asociados a respuesta inmune, por lo tanto, la identificación de genes nuevos (Amos *et al.*, 2011). El procedimiento a seguir depende de la información disponible, en especies donde el genoma completo es conocido, quizá el mejor método sea el de "genoma completo," y en especies con poca información genómica, el método recomendable es el de identificación de genes específicos (le Roex *et al.*, 2013).

A la fracción de la variación poblacional que puede ser explicada por factores genéticos se le conoce como heredabilidad (h^2). Así, para evaluar el alcance de la contribución genética a un fenotipo en particular, por ejemplo, resistencia en enfermedades, que esté controlado por la composición genética del huésped (Romero *et al.*, 2002; le Roex *et al.*, 2013), es necesario estudiar la asociación entre marcadores genéticos y la característica de interés en las poblaciones. Todo indica que los factores que influyen en el desarrollo de una infección por patógenos son varios (le Roex *et al.*, 2013), uno de ellos es sin duda el genoma del hospedero. Por lo tanto, la identificación de variantes genéticas involucradas en la susceptibilidad o la resistencia a la tuberculosis proporcionaría información de suma utilidad práctica para la identificación de estructuras blanco para hacer selección genética de

animales resistentes a la enfermedad. Se sabe que los factores genéticos del hospedero interactúan con factores ambientales y el genoma del patógeno para determinar el perfil de la enfermedad. Desde luego, el resultado de la interacción entre estos factores es la manifestación clínica de la enfermedad (le Roex *et al.*, 2013).

2.7 Genes asociados a resistencia

El estudiar el patrón de expresión génica de un fenotipo en particular da lugar a la identificación de genes candidatos, como el gen *SLC11A1*, que media la actividad de los macrófagos contra parásitos intracelulares durante las primeras etapas de la infección (Finlay *et al.*, 2012). En los estudios de expresión génica se pretende identificar la transcripción de genes que se expresaran diferencialmente en los grupos de animales para identificar los marcadores de infección que garanticen, en conjunto con datos genéticos de la población, la selección de animales resistentes o susceptibles a la enfermedad (le Roex *et al.*, 2013). Estudios de expresión génica que han usado infección natural por Tb en ganado han identificado genes que son expresados diferencialmente entre animales infectados y no infectados con *M. bovis*. Los más frecuentes son: *ADAM17*, *CXCR3*, *IER5*, *PHB2*, *CD84*, *TBK1*, *TLR2*, *TLR3*, *BCL2*, *NFATC4*, *IFNG*, *IFNGR1*, *TNFSF13B*, *KIAA1971*, *SLAMF1*, *CASP1*, *DEFB10*, *IFNAR1*, *KIR3DS1*, *MYD88*, *PTPN2*, *STAT1*, *STAT2*, *TREM1*, *TYK2*, *TYROBP*, *CD83*, *CTLA4*, *IL1A*, *IL8*, and *IL15* (Meade *et al.*, 2006; Meade *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2009; Killinck *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que algunos otros patógenos tales como *Brucella abortus* y *Mycobacterium avium paratuberculosis* pueden operar de la misma manera que *M. bovis* y, por lo tanto, al seleccionar animales por resistencia a la Tb, puede también beneficiar al control de las enfermedades causadas por estos microorganismos. Varios de estos genes están asociados a la respuesta del sistema inmune, muchos de los cuales, *VDR*, *IFNG* y *TLR2* también se han asociado en estudios de Tb en humanos (Bukhari *et al.*, 2015).

2.8 Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP)

El ADN se compone de cuatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y uracilo. Cuando se detectan diferencias en una sola base se le conoce como polimorfismos

de nucleótido único (SNP) (por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphism*). La ubicación de los SNP puede estar asociada a genes relacionados a características importantes en los individuos (Matukumalli *et al.*, 2009). A partir de parámetros genéticos como heredabilidad (h^2), correlaciones genéticas, varianzas y covarianzas, se identifican los polimorfismos dentro de las secuencias de genes que pudieran tener efectos sobre los rasgos productivos, generando parámetros genéticos más precisos (Martínez *et al.*, 2012). Los estudios de asociación se comparan las frecuencias de los alelos de los marcadores específicos entre los individuos infectados, los enfermos, los no infectados y los no enfermos. Los estudios de asociación se dividen en aquellos que tienen un gen como candidato y los que estudian todo el genoma. Dentro de los genes candidatos se investigan los SNP, considerados de importancia biológica. En el caso de tuberculosis se busca seleccionar genes implicados en la respuesta inmune o aquellos que han demostrado estar asociados a otras enfermedades infecciosas (le Roex *et al.*, 2013).

Existe evidencia de que la estructura genética de los individuos juega un papel importante en el desarrollo de la tuberculosis, tanto para humanos como para animales. Estudios con gemelos han demostrado que el desarrollo de la enfermedad es más probable en homocigóticos que en heterocigóticos (Comstock *et al.*, 1978). En 1926, 251 bebés accidentalmente fueron “vacunados” con una cepa viva virulenta de *M. tuberculosis*, la cual mostró una amplia gama de respuestas a la infección, lo que demostró la existencia de factores innatos que influyen en el desarrollo de la infección (Rieder, 2003). En el caso específico de *M. bovis*, en los años 40 se encontró que dos cepas consanguíneas de conejos mostraron dos fenotipos, susceptibles o resistentes, después de la infección con *M. bovis*, lo que sugirió que el perfil de la enfermedad desarrollada por los conejos tenía un fuerte componente de herencia genética (Lurie, 1944). La diferencia de susceptibilidad de ratones a la cepa vacunal BCG de *M. bovis* llevó a la identificación del primer locus de susceptibilidad a la Tb, conocido como el gen *Nramp1* (Lurie, 1944). En estudios específicos de resistencia a la tuberculosis, Ameni *et al.*, (2007) demostraron diferentes niveles de susceptibilidad para cebú, cruza de Cebú-Holstein y el ganado Holstein en condiciones de

campo. Se observó mayor prevalencia de Tb en el ganado Holstein en comparación con el Cebú o Cebú-Holstein. Otros estudios han reportado resultados similares (Biffa *et al.*, 2012).

La identificación de resistencia genética a tuberculosis se ha intentado en otros países (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2005; Naranjo *et al.*, 2008; Driscoll *et al.*, 2011; Kadarmideen *et al.*, 2011; Finlay *et al.*, 2012) y la información generada se ha implementado ya en programas de mejora genética del ganado para el caso de mastitis (Rupp and Boichard, 2003).

Birmingham *et al.*, (2009) estimó los índices de heredabilidad en 0.14 y 0.18 para la respuesta positiva a la prueba de la tuberculina y la infección confirmada de Tb en ganado Holstein. Así mismo, estudios en venado rojo han demostrado que esta es una raza muy susceptible a la tuberculosis, demostrando diferente susceptibilidad y transmisión, sugiriendo fuertes bases genéticas de resistencia; la heredabilidad de resistencia a la Tb fue estimada en 0.48. En venado cola blanca se demostró que los animales con infección eran más similares genéticamente entre ellos que los no infectados (Qureshi *et al.*, 1995).

Existen estudios donde se han encontrado SNP en el cromosoma 22 asociados a la susceptibilidad a Tb (Finlay *et al.*, 2012). En otro estudio de casos (592) y controles (559) realizado en bovinos Holstein, se genotipificaron con marcadores de alta densidad (777,692 SNP), y mediante un análisis de asociación de todo el genoma (GWAS por sus siglas en inglés *Genome Wide Association Study*) se encontraron 3 SNP asociados significativamente con resistencia a Tb en los cromosomas 2 y 13 (Birmingham *et al.*, (2014). Por otra parte Richardson *et al.*, (2016), utilizando chip de alta densidad (777,692 SNP) en 3,240 hatos lecheros irlandeses divididos en dos grupos: casos y controles, de acuerdo a sus resultados a la prueba de la tuberculina, asumiendo el mismo nivel de exposición obtuvieron un SNP (BovineHD0100019801) localizado en el cromosoma 1 y asociado a la susceptibilidad a Tb, y un SNP (Hapmap50596-BTA-121389), con el alelo T mayor en el cromosoma 23 asociado con la resistencia a Tb. Lo que indica que los SNP pueden ser asociados con características de interés en los animales y que pueden tener un efecto protector contra *M. bovis* (Bhaladhare *et al.*, 2016), o contra la infección de tuberculosis pulmonar causada por *M. tuberculosis* en humanos (Qu *et al.*, 2007), o inclusive tienen asociación con genes como el NOS2, el cual es

esencial para la regulación de óxido nítrico que puede llegar a matar o limitar el crecimiento de *M. tuberculosis* (Cheng *et al.*, 2016). En el siguiente cuadro se aprecian polimorfismos (SNP) de interés en la susceptibilidad y/o resistencia a *M. bovis* en bovinos domésticos y otras especies de fauna silvestre.

Cuadro 1. Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) asociado a resistencia y/o susceptibilidad a tuberculosis bovina.

<i>SNP</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Asociado a:</i>	<i>Referencia</i>
ARS-BFGL-NGS-60576	22	Susceptibilidad a <i>M. bovis</i> . Ubicados en el gen <i>SLC6A6</i> .	Finlay <i>et al.</i> , 2012
ARS-BFGL-NGS-21481	22		
ARS-BFGL-NGS-102776	22		
rs136617760	2	Resistencia a <i>M. bovis</i>	Bermingham <i>et al.</i> , 2014
rs42494357	13		
rs110465273	13		
rs42494342	13		
rs109809949	13		
rs109042660	13		
rs137562332	13		
rs132841890	13		
Hapmap50596-BTA-121389	23		
SNP41	12		
BovineHD0100019801	1	Asociado a la susceptibilidad a tuberculosis	Richardson <i>et al.</i> , 2016
SNP137	26	Susceptibilidad a <i>M. bovis</i>	le Roex <i>et al.</i> , 2013
SNP144	11		
g.27534932A>C		SNP en el gen TNF- α asociado con el riesgo de tuberculosis bovina	Cheng <i>et al.</i> , 2016
rs55617172	17	Resistencia a <i>M. bovis</i>	Bhaladhare <i>et al.</i> , 2016
<i>NRAMP1</i> (Natural resistance associated macrophage protein 1) codificado por el gen <i>SLC11A1</i>		Asociado significativamente con una baja incidencia de TB	Kadarmideen <i>et al.</i> , 2011

2.9 Controles de calidad de SNP

Equilibrio Hardy-Weinberg (HW)

La ausencia de migración, mutación, selección natural y el apareamiento selectivo se le conoce como el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), el cual determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. Antes de realizar el análisis de asociación se deberá comprobar que la población se encuentra en equilibrio, las desviaciones en el HW pueden indicar endogamia, estratificación de la población o incluso problemas en el genotipado (Iniesta *et al.*, 2005; Wigginton *et al.*, 2005). Uno de los estadísticos usados para comparar las frecuencias observadas con las esperadas basadas en el HW es chi-cuadrada, la cual evalúa la probabilidad de observar individuos homocigotos para el tamaño de muestra fijo (Salanti and Ioannidis, 2008). En algunos estudios al realizar el control de calidad, si el MAF es menor a 27% o el HW es 0.2 se descartan esos SNP ya que no cumplen con el control de calidad esperado y así evitar SNP que pudieran representar falsas asociaciones (Finlay *et al.*, 2012).

Frecuencia del Alelo Menor (MAF)

La (MAF), como su nombre lo indica es la frecuencia del alelo menor en un determinado locus dentro de una población, es una medida utilizada para estudiar la variación genética y que proporciona información sobre las variantes frecuentes o menos frecuentes dentro de una población en estudio. Por tanto, es fundamental entender el efecto de MAF en la probabilidad de obtener resultados falsos positivos, como lo indica Tabanjin *et al.*, (2009), donde indica que los loci con bajo MAF (<10%) tienen un poder significativamente menor para detectar a los verdaderos positivos o los riesgos genotípicos; o como en el estudio realizado por Richardson *et al.*, (2016), donde SNP con MAF menor a 0.02 y derivados del HW ($P < 0.1 \times 10^{-8}$), fueron desechados. Aunque se encontró también un SNP en el cromosoma 23 con un MAF de 0.1361, indicando que los animales homocigotos para ese alelo eran más resistentes a la infección a Tb.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la distribución espacio-temporal de cepas de *M. bovis* en el estado de Jalisco y compararlo con la distribución en el resto del país, e identificar variaciones genéticas implicadas en la susceptibilidad y/o resistencia a TBb en el ganado Holstein de México.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar la distribución espacio-temporal de *M. bovis* en el estado de Jalisco y el resto del país mediante spoligotyping.

Identificar fenotipos a través de la discriminación de casos (lesión y cultivo positivo) y controles (no lesión y cultivo negativo).

Identificar variaciones genéticas (SNP) asociados con la resistencia a la tuberculosis en el ganado Holstein de México.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Aislados de *M. bovis*

Se obtuvieron 337 aislados de *M. bovis* del ganado en el estado de Jalisco y 1,152 aislados del resto del país durante los años 1997-2015.

4.1.2 ADN para *spoligotyping*

El ADN para *spoligotyping* fue obtenido por el método de CTAB-cloroformo, según de Almeida *et al.* (2013). En resumen, se transfirieron un total de 500 µl de colonias suspendidas en el tampón TE 1X a lisozima (10 mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se agregó proteinasa K y dodecilsulfato de sodio al 10%, y la suspensión se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se añadió una solución que consistía en una mezcla de NaCl y CTAB (NaCl 5 M y CTAB al 10%), y la suspensión se incubó durante 30 minutos a 65°C. Finalmente, el ADN se extrajo luego con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió isopropanol. La suspensión se mantuvo a -20 ° C durante 2 horas y se centrifugó durante 15 min a 14.000 g. El sedimento se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 g, y se agregaron 50 µl de tampón TE.

4.1.3 Espoligotipificación

La técnica de *spoligotyping* se realizó de acuerdo con lo realizado por Kamerbeek *et al.*, (1997). La región DR (direct repeat) se amplificó utilizando los cebadores DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC, 5_ biotinilados) y DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC). El producto amplificado se hibridó a una membrana de nailon a la que se unieron covalentemente 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG (Isogen Bioscience BV, Maarssen, Países Bajos). Para la detección de ADN hibridante, se utilizó el sistema de detección de ECL quimioluminiscente (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ), seguido de la exposición a una película de rayos

X (Kodak) durante 45 min. Los espoligotipos fueron nombrados según el sitio web *M. bovis* spoligotype (www.mbovis.org).

4.1.4 Análisis filogenético

Los datos de los espoligotipos se convirtieron en datos de caracteres binarios (ausentes = 0 y presentes = 1) para las 43 posiciones de hibridación de la sonda. La relación genética entre los espoligotipos se determinó utilizando el algoritmo MIRU-VNTRplus disponible en www.miruvnrplus.org. La relación evolutiva se determinó a través de spoligoforest en la página web de spolTools (www.emi.unsw.edu.au/spoltools/) para todos los espoligotipos agrupando al menos tres aislamientos. Spoligoforest proporciona un árbol genético evolutivo que muestra la relación más probable de todos los espoligotipos en el conjunto de datos (Reyes *et al.*, 2008). Este algoritmo usa un modelo que considera las mutaciones por eliminaciones irreversibles de espaciadores y asigna probabilidades a la longitud de estas eliminaciones. El número de aislamientos en el clúster determina el tamaño de cada nodo en el árbol. Los bordes entre los nodos reflejan las relaciones evolutivas entre los espoligotipos con puntas de flecha que apuntan a los descendientes. Los espoligotipos de Jalisco se combinaron con los espoligotipos de otros Estados de México para determinar el nivel de diseminación de *M. bovis* en el país.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Muestras biológicas

Se recolectaron muestras biológicas de linfonodos y pelo de bovinos adultos de raza Holstein de rastros en los estados de Jalisco y Aguascalientes. Estos dos estados están ubicados en el centro de México, donde la prevalencia de TBb es aproximadamente del 16%.

Las muestras biológicas incluyeron linfonodos ubicados en cabeza (retrofaríngeo), tórax (traqueobronquial y mediastino), abdomen (mesentérico) y pulmón; además de pelo para la posterior extracción de ADN. Las muestras de tejido se recolectaron en animales con lesiones visibles y animales sin lesiones visibles en la inspección de la canal. Después de la recolección, las muestras de tejido se colocaron inmediatamente en un refrigerador con hielo

y se llevaron al laboratorio donde se mantuvieron a -20°C hasta el análisis. Los datos epidemiológicos para cada animal incluyeron localización, sexo, edad, y órgano afectado, y se utilizaron para evaluar la homogeneidad de la prevalencia de TBb.

4.2.2 Análisis bacteriológico

Todas las muestras de tejido se cultivaron en medios Stonebrink y Lowenstein-Jensen con piruvato para el aislamiento de *M. bovis*. En resumen, las muestras de tejido se descontaminaron primero con una solución 1: 1000 de hipoclorito de sodio, y luego se maceraron y se descontaminaron con una solución al 10% de ácido clorhídrico como se informó anteriormente.

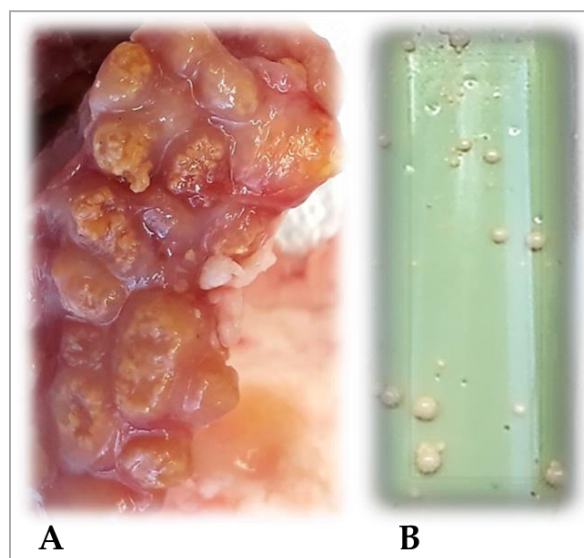


Figura 2. Ganglios linfáticos retrofaríngeos con lesiones visibles de TBb (A). Colonias de *M. bovis* en medios Stonebrink (B).

4.2.3 Diseño experimental, extracción de ADN, agrupación y genotipado

Se utilizó un diseño selectivo de agrupamiento de ADN en este estudio para identificar las regiones QTL asociadas a la resistencia a TBb en un estudio de casos y controles.

Un total de 375 muestras biológicas se incluyeron en el estudio, 150 casos (muestras de tejido con lesiones visibles y cultivo positivo) y 225 controles (muestras de tejido sin

lesiones visibles y cultivo negativo), recolectadas de canales. Todas las muestras procedían de la misma área geográfica y, en algunos casos, del mismo hato, para asegurar un nivel similar de exposición al patógeno.

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El control de cantidad y calidad en cada muestra de ADN se realizó mediante espectrofotometría con un equipo NanoDrop™ 2000 (ThermoFischer Scientific). La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Todas las muestras de ADN se normalizaron a una concentración de 50 ng/μL. Los grupos de ADN se construyeron tomando cantidades equivalentes de volumen de cada muestra de ADN, por lo que la concentración final para cada grupo fue de 50 ng/μL de acuerdo con los requisitos de Illumina.

Un total de 75 muestras de ADN se usaron en la construcción de cada grupo (pool), y las réplicas biológicas. Los grupos de casos se compusieron con dos grupos independientes de 75 animales positivos a lesiones visibles y positivos al aislamiento de *M. bovis* por cultivo (Figura 1). Estos dos grupos representan dos réplicas biológicas independientes. Los grupos para los controles se compusieron con tres grupos independientes de 75 animales (es decir, tres réplicas biológicas) sin lesiones visibles y aislamiento negativo de *M. bovis* por cultivo. Cada una de las agrupaciones se produjo en dos réplicas para tener en cuenta los posibles errores en la agrupación de individuos (es decir, agrupación de réplicas técnicas). Además, cada uno de los grupos de ADN se genotipo tres veces para tener en cuenta el error técnico de la matriz (Cuadro 2).

Cuadro 2. Esquema de agrupaciones para casos (CA), controles (CT) y genotipado.

CASOS			CONTROLES		
Biológica	Técnica		Biológica	Técnica	
Bio_rep^a	Pool_Rep^b	Array_Rep^c	Bio_rep^a	Pool_Rep^b	Array_Rep^c
CA_1	CA1_A	CA_1A_1	CT_1	CT1_A	CT_1A_1
		CA_1A_2			CT_1A_2
		CA_1A_3			CT_1A_3
	CA1_B	CA_1B_1	CT_2	CT1_B	CT_1B_1
		CA_1B_2			CT_1B_2
		CA_1B_3			CT_1B_3
CA_2	CA2_A	CA_2A_1	CT_3	CT2_A	CT_2A_1
		CA_2A_2			CT_2A_2
		CA_2A_3			CT_2A_3
	CA2_B	CA_2B_1	CT_3	CT2_B	CT_2B_1
		CA_2B_2			CT_2B_2
		CA_2B_3			CT_2B_3
			CT_3	CT3_A	CT_3A_1
					CT_3A_3
					CT_3A_3
			CT_3	CT3_B	CT_3B_1
					CT_3B_3
					CT_3B_3

^aPool_Ind = Pool independiente; ^bPool_Rep = Réplica del pool; ^cArray_Rep = Réplica técnica del pool.

Las 30 agrupaciones (réplicas biológicas y técnicas) se procesaron en tres repeticiones de matriz cada una, en los BeadChips de Illumina BovineHD (777,962 SNP), siguiendo el protocolo Infinium Illumina, obteniendo un total de 30 conjuntos de frecuencias de alelos B para cada SNP. La posición de los SNP se determinó de acuerdo con el conjunto bovino UMB 3.1.

4.2.4 Análisis estadístico del agrupamiento de ADN

Los valores de las frecuencias alélicas B (BAF) para cada SNP se obtuvieron a partir del algoritmo de auto-normalización del software Illumina BeadStudio® para cada una de las 3 matrices de réplicas técnicas de las 10 agrupaciones.

Primero, se realizó un control de calidad en la réplica técnica de la matriz, comparando la distribución SD de las frecuencias del alelo B entre cada triplete de réplicas técnicas de la matriz. Dos matrices de réplicas, un caso y un control se eliminaron del análisis

porque el valor de su frecuencia de alelo B divergió de las otras dos réplicas de matrices técnicas. En segundo lugar, se realizó un control de calidad en la estimación de BAF a nivel de SNP de la siguiente manera: se calculó la desviación estándar (SD) entre los ensayos de repetición (réplicas técnicas biológicas, agrupadas y de matriz) dentro de los casos y controles, y los marcadores. Se excluyeron del análisis las mayores 10% de SD. Finalmente, solo se retuvieron los SNP con frecuencia de alelos menores (MAF) ≥ 0.05 . Después de la edición, se utilizaron un total de 438,555 SNP (de los cuales 10,034 estaban en BTX) en el análisis de asociación.

El GWAS se realizó comparando en cada marcador las frecuencias alélicas obtenidas para las agrupaciones de casos con las obtenidas en las agrupaciones de control para cada marcador (promediado sobre las repeticiones dentro del caso y dentro del control) de acuerdo con el diseño y los métodos de agrupación selectiva de ADN (SDP) descritos detalle. El GWAS se realizó después de excluir los SNP monomórficos, los SNP asignados en BTY, los SNP mitocondriales y los SNP sin posición cromosómica.

Se utilizó una prueba de marcador único para la asociación marcador-rasgo, y el valor de P para cada marcador se calcula como:

$$Z_{test} = D_{test} / SD (D_{null})$$

Donde: *D_{test}* es la diferencia de las frecuencias de alelo B entre las colas, y *D_{null}* es la diferencia de las frecuencias de alelo B dentro de las colas.

4.2.5 Definición de región de loci de rasgos cuantitativos (QTLR)

Los valores nominales de P en diferentes umbrales de PFP, es decir, 1%, 5% y 10%, se han identificado según Fernando *et al.*, (2004) y el correspondiente $-\log_{10}$ (valor P) calculado, que resulta: i) para PFP al 1%, 4.58; ii) para PFP al 5%, 3.17; iii) para PFP al 10%, 2.53. Como en Lipkin *et al.*, (2016) los promedios móviles de $-\log_{10}$ (valores P) se calcularon considerando una ventana de 16 marcadores SNP, que corresponde a un tamaño promedio de ventana de aproximadamente 100 Kb. Como se muestra en Lipkin *et al.*, (2016) la PFP es el enfoque apropiado para corregir pruebas múltiples cuando el enfoque de

promedios móviles propuesto por los mismos autores se utiliza para identificar las regiones QTL. Como tal, los valores promedio de la ventana por encima de los umbrales de PFP de 1%, 5% y 10% se han considerado como el promedio de QTL principal. Una caída de 1 registro en los valores promedio flanqueantes definió los límites de la región QTL (QTLR). El SNP principal es el que muestra el mayor $-\text{Log}_{10}$ (valor P) entre los de cada QTLR.

4.2.6 Anotación funcional del QTLR

La base de datos en línea SNPchiMp se utilizó para hacer coincidir el nombre de Illumina SNP con el SNP rsID. El navegador de variantes del Archivo de Variación Europea (EVA) de EMBL-EBI permitió anotar todos los SNP principales a través del rsID. Se utilizó el conjunto completo de genes (*Bos taurus*: Ensemble Gene 92). Se realizó una anotación funcional de ontología de genes (GO) y análisis de la ruta KEGG utilizando la ontología de genes (GO) y análisis de rutas utilizando el software DAVID Bioinformatics Resources, versión 6.8. Además, las QTL bovinas disponibles de la base de datos de Genoma Animal se catalogaron en nuestras QTLR por superposición.

STRING se usó para investigar la existencia de redes de genes en el ganado bovino entre las QTLr identificadas con PFP al 10%. Los que se encuentran en la red de genes fueron anotados por STRING utilizando tanto bases de datos bovinas como humanas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXPERIMENTO 1

De los 337 aislamientos se obtuvieron 59 espoligotipos, diez de estos incluían el 48% de todos los aislados de Jalisco: SB0673, SB0971, SB0669, SB0140, SB0145, SB0121, SB0663, SB0269, SB1116 y SB0119. Al comparar los espoligotipos de Jalisco con los de otros estados, se encontró que los espoligotipos más frecuentes en Jalisco también fueron los más frecuentes en otros estados de México. Cinco espoligotipos de Jalisco fueron comunes entre ganado de carne y lechero, lo que sugiere cepas relacionadas (Cuadro 3).

<i>Cuadro 3. Espoligotipos más frecuentes de M. bovis en Jalisco y el resto del país por función zootécnica</i>													
Estado	Función Zootécnica	Espoligotipos (SB)											
		0673	0971	0669	0140	0145	0121	0663	0269	1116	0119	Otros	Total
Jalisco	Leche	35	14	30	15	18	10	10	8	7	9	163	319
	Carne	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	5
	Desconocido	2	0	0	0	0	0	0	1	2	1	7	13
	Total	37	14	30	16	18	10	12	9	9	10	172	337
Otros Estado	Leche	148	60	67	75	66	70	27	21	13	11	284	842
	Carne	8	19	13	4	0	0	7	5	10	1	24	91
	Desconocido	22	33	13	14	10	4	4	7	10	3	99	219
	Total	178	112	93	93	76	74	38	33	33	15	407	1152
Gran Total		215	126	123	109	94	84	50	42	42	25	579	1489

De los 1,152 aislamientos del resto del país se obtuvo un total de 159 espoligotipos, que incluían el 56% de todos los aislamientos en el conjunto de datos, 98 no pertenecían a ningún patrón de espoligotipos. De todos los aislamientos en el conjunto de datos, 1.161 provinieron de ganado lechero y 96 de ganado de carne; el resto no tenía registro (Cuadro 3).

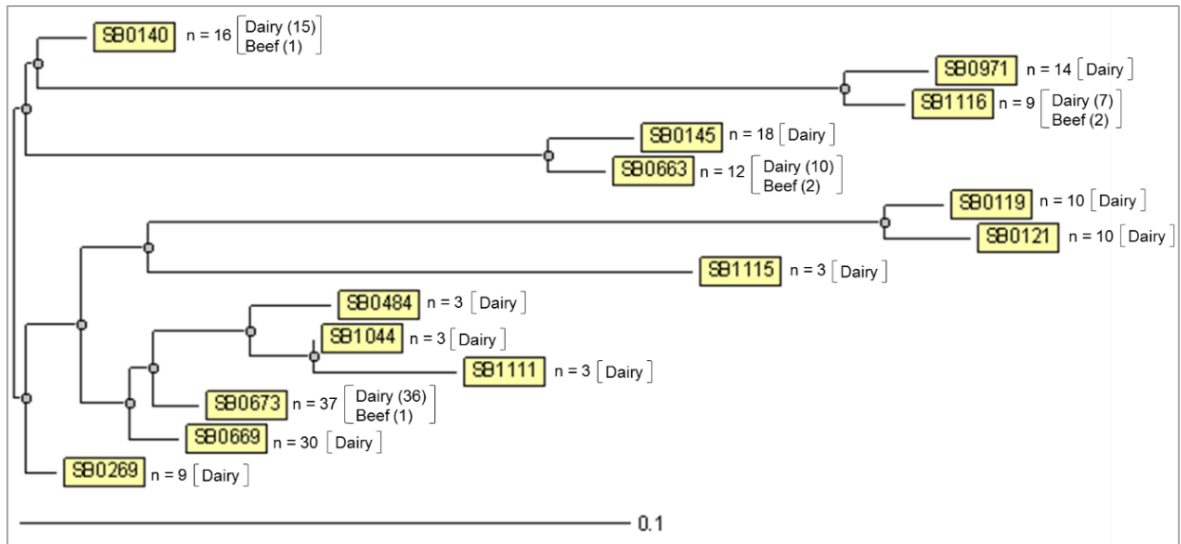


Figura 3. Árbol filogenético de aislados de *M. bovis* en el estado de Jalisco. (Los números en paréntesis indican el número de aislados por función zootécnica).

La Figura 3, muestra el árbol filogenético de espoligotipos de Jalisco, que contiene grupos de al menos tres aislamientos cada uno. Se formaron ocho grupos en este árbol: uno con tres subgrupos con nueve aislamientos cada uno, todos de ganado lechero. Cuatro con dos aislamientos, que incluyen ganado lechero y de carne, y tres con un subgrupo; uno que incluye un aislado de ganado de carne. Los aislamientos de otros estados que coinciden con los espoligotipos de Jalisco se describen en el cuadro 2. Todos los espoligotipos de Jalisco se encontraron en otros estados, cuatro de los más frecuentes de Jalisco: SB0673, B0971, SB0669 y SB0140, también fueron los más frecuentes en otros estados, algunos espoligotipos son comunes al ganado lechero y ganado de carne, sugiriendo cepas relacionadas de tuberculosis entre estas.

La Figura 4 muestra la disposición jerárquica (spoligoforest) de aislados de *M. bovis* del estado de Jalisco, donde la continuidad de las líneas indica hipotéticamente la relación evolutiva entre los espoligotipos. La línea continua indica una relación más fuerte. El

spoligoforest muestra dos árboles con componentes conectados. El árbol más grande, el que tiene la mayor cantidad de ramas, está arraigado por la cepa SB0140, lo que sugiere que esta es la cepa más antigua del árbol.

Un total de 141 aislamientos descendieron de SB0140 en cuatro grupos claramente definidos de 9 a 37 aislamientos cada uno. La hipotética relación evolutiva entre los spoligotypes SB0140 y SB0673, el spoligotipo con el grupo más grande en el conjunto de datos, es fuerte, lo que sugiere un pequeño número de cambios en la secuencia de la región DR. el spoligotipo SB0669, el segundo clúster más grande, tiene una relación fuerte con SB0673, pero no está conectado directamente al SB0140, lo que sugiere una nueva ruta evolutiva. Los spoligotipos SB0145, SB0269 y SB0971 descienden directamente de SB0140. SB0145 y SB0971 tienen su propia ruta de evolución, ya que otros spoligotipos se derivan de ellos (SB0663 y SB1116, respectivamente). Desde el segundo árbol, enraizado por el spoligotipo SB0121, solo se forma un linaje, dando origen a la cepa SB0119.

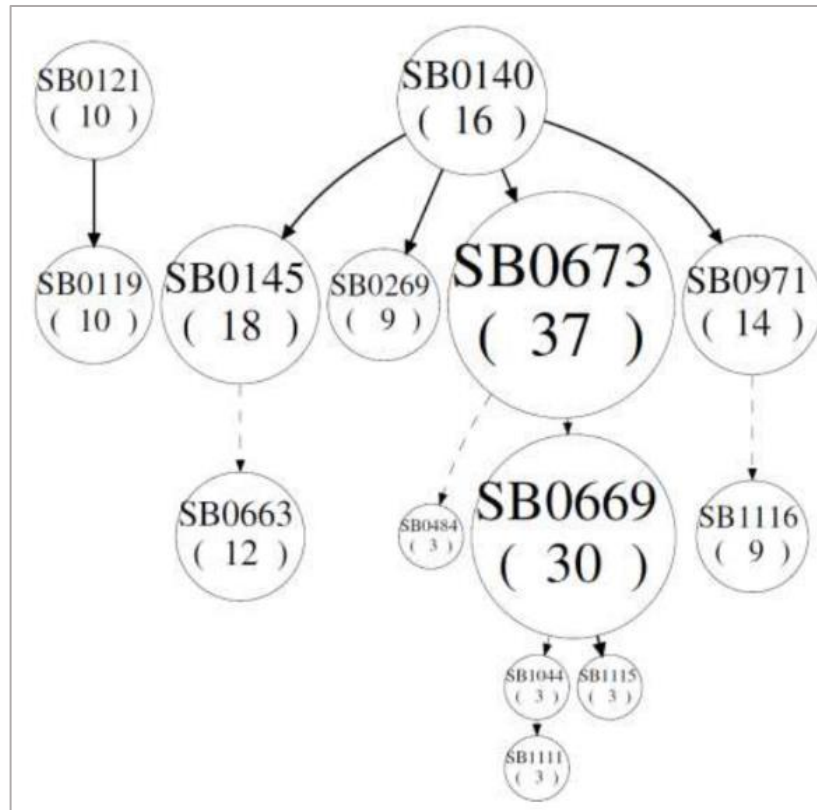


Figura 4. Spoligoforest de *M. bovis*, espoligotipos obtenidos en Jalisco, México. Los nodos están etiquetados con el identificador SB como se indica en mbovis.org; los números entre paréntesis indican el tamaño del grupo. Las líneas entre nodos reflejan relaciones evolutivas hipotéticas entre espoligotipos con flechas que denotan descendencia. Las líneas continuas indican una relación más fuerte.

La Figura 5 muestra el árbol filogenético de aislamientos de *M. bovis* de Jalisco y del resto del país. Al igual que los espoligotipos de Jalisco, los otros estados muestran dos árboles separados, que se originan también de SB0121 y SB0140. La única gran diferencia entre los dos árboles es la presencia del espoligotipo SB0971, con un gran número de aislamientos en una rama separada, lo que sugiere una nueva línea genética. Como ya se había mencionado, el espoligotipo SB0140 parece ser el más antiguo en el país.

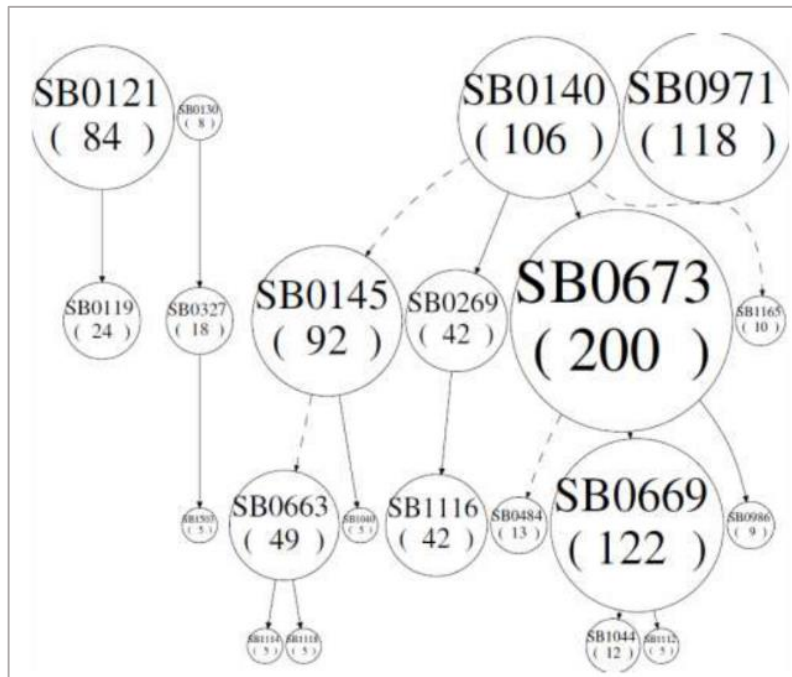


Figura 5. Relación filogenética de los espoligotipos de *M. bovis* obtenidos en Jalisco y en el resto del país. Los nodos están etiquetados con el identificador SB, como se indica en mbovis.org; los números entre paréntesis indican el tamaño del grupo. Las líneas entre nodos reflejan relaciones evolutivas hipotéticas entre espoligotipos con flechas que denotan descendencia. Las líneas continuas indican una relación más fuerte. Fuente: <http://spoltools.emi.unsw.edu.au/>.

Los espoligotipos SB0673 y SB0669 fueron los espoligotipos más frecuentes en Jalisco. Estos espoligotipos SB0971 y SB0669 también fueron los más frecuentes en el resto del país; sin embargo, este hecho no significa necesariamente que Jalisco sea la fuente de infección, ya que no se pudo obtener evidencia epidemiológica que relacione estas cepas. Se sabe que Jalisco es una fuente importante de reemplazos (vaquillas) para hatos en otras regiones de México en circunstancias especiales; sin embargo, esto no se pudo confirmar debido a la falta de información sobre el movimiento de ganado. Se sabe de manera extraoficial que Jalisco actuó como una fuente de reemplazos lecheros para otras regiones durante los años 2003-2006, cuando México cerró la frontera a la importación de ganado de Estados Unidos (EE. UU.) y Canadá debido al brote de encefalopatía espongiforme bovina.

Los EE. UU. y Canadá son las principales fuentes de vaquillas de reemplazo para México. Sin embargo, no se sabía cuál era la distribución de cepas de *M. bovis* en el país antes de ese evento, para comparación.

El ganado de carne y lechero se mantiene bajo diferentes condiciones en México. El ganado lechero se cría en entornos intensivos cercanos con una gran cantidad de ganado por metro cuadrado; en algunas regiones es posible observar 10,000 vacas en una sola unidad de producción. Por el contrario, el ganado de carne se cría en áreas extensas abiertas con un número bajo de ganado por hectárea. Debido a esto, la prevalencia de TBb en el ganado lechero es aproximadamente del 16% y en el ganado de carne 0.5% (Plan Estratégico de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina en México, 2008-2012). Por lo que, las poblaciones de ganado lechero infectado puede ser un riesgo para las poblaciones de ganado de carne. Catorce de los aislados del ganado de carne tenían espoligotipos SB0673 o SB0669, dos de los más frecuentes en el ganado lechero, sugiriendo la transmisión entre las razas. Desde el punto de vista epidemiológico, esto es relevante porque la transmisión del ganado lechero al ganado de carne podría poner en peligro los objetivos del programa nacional para erradicar a la TBb, y la exportación de terneros, una fuente importante de divisas para la industria ganadera mexicana, puede verse amenazada. En este estudio, no se sabe, sin embargo, si los animales de carne que se encuentran infectados son de ganado para operaciones de carne o de lecherías, donde a veces, los toros de carne se utilizan para criar vacas con problemas reproductivos, y los terneros se crían para el engorde en la misma granja.

A pesar de que se produjo la agrupación de aislados, la diversidad de espoligotipos es amplia. Esto concuerda con informes anteriores (Cobos-Marín *et al.*, 2005; Santillán-Flores *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2008; Pérez-Guerrero *et al.*, 2008; Bobadilla-del Valle *et al.*, 2015; Sandoval-Azuara *et al.*, 2017), donde a pesar de estudiar muestras de diferentes regiones específicas de México, la diversidad de cepas ha sido evidente, lo que sugiere un intercambio intenso y continuo de animales, y nuevas líneas genéticas emergentes como consecuencia de la alta prevalencia de tuberculosis en el ganado lechero.

El spoligoforest demuestra todas las posibles relaciones de espoligotipos bajo el supuesto de mutación del espoligotipo, con la inestabilidad genética que se extiende de 10 a 20 años (Brosch *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006). En el conjunto de datos, la raíz más grande del árbol fue el espoligotipo SB0140, este ha infectado bovinos, venados, tejones, personas en Irlanda y ganado en el Reino Unido (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006; McLernon *et al.*, 2010), también se ha descrito como el espoligotipo más frecuente en cerdos (Barandiaran *et al.*, 2011), ganado bovino y gatos en Argentina (Zumárraga *et al.*, 2009) y humanos en los Estados Unidos (Rodwell *et al.*, 2008) y México (Bobadilla-del Valle *et al.*, 2015). El espoligotipo SB0140 se ha estudiado a fondo en el Reino Unido (Smith *et al.*, 2003). Se concluyó que la frecuencia de las cepas con SB0140 en ese país no puede explicarse por una deriva aleatoria sin selección. Se ha concluido que algunos genotipos aumentan en número en una región específica en una "expansión clonal" mediante la selección de mutaciones favorables cuando algunas células encuentran nuevas especies huésped o nuevas regiones geográficas. En México, se cree que ambas situaciones son posibles al menos para los espoligotipos más frecuentes: selección de mutaciones favorables debido a la alta prevalencia de *M. bovis* en la población y oportunidad ecológica por el movimiento indiscriminado de animales entre regiones.

Los grupos con espoligotipos de *M. bovis* similares o muy similares se consideran el resultado o transmisión reciente, y aquellos que no presentan un patrón de espoligotipo surgen de la migración o reactivación de infecciones adquiridas (Luciani *et al.*, 2008). Sin embargo, otros factores pueden estar involucrados en esa agrupación, es decir, el muestreo y la tasa de mutación del marcador molecular utilizado en la toma de huellas dactilares (Tanaka y Francis, 2005). En el estudio actual, se producen tanto agrupamientos como una alta frecuencia de espoligotipos sin patrón específico. La agrupación podría ser una consecuencia de las condiciones en las que se mantiene el ganado lechero, en poblaciones de alta densidad y como resultado del movimiento indiscriminado de animales entre regiones o de la alta prevalencia de la enfermedad, lo que da lugar a nuevos linajes genéticos. Algo que queda claro en el estudio actual es que la información molecular en sí misma no es suficiente para explicar la epidemiología de una enfermedad. En el presente estudio, no se pudieron obtener

datos sobre el movimiento de los animales de Jalisco a pesar de una búsqueda intensiva de datos, y esto es claramente una debilidad de este estudio. Esto sugiere que se requiere más conocimiento sobre metodologías epidemiológicas, especialmente el mantenimiento de bases de datos por parte de los organismos responsables de la atención de la salud animal en México.

5.2 EXPERIMENTO 2

De los 375 animales incluidos en el estudio, 33% eran machos y 63% hembras, de 12 a 108 meses; 44 meses fue la edad más frecuente (22%). Del grupo de casos, las lesiones se encontraron principalmente en los ganglios linfáticos de la cabeza (retrofaríngeo 51%) y tórax (mediastínico y traqueobronquial, 61%); algunos animales tenían lesiones en más de un ganglio linfático.

QTLRs asociados con resistencia/susceptibilidad a TBb

Se identificaron un total de 154 QTLR al 10% de PFP (Apéndice A1, Figura 6). En general, todas estas regiones se distribuyeron homogéneamente en todos los autosomas (excepto en BTA15 y BTA17), y en el cromosoma X (n. 2), definidos por 3.296 SNP. La longitud promedio de los QTLR fue de 93,446 pb. Del total de QTLR encontrado, 154 estaban en el 10% de PFP, 42 en el 5% de PFP y 5 en el 1% de PFP, El apéndice A1, también incluye información sobre el SNP principal para cada QTLR, el número de SNP que definen las regiones, su posición en el cromosoma y su ubicación en los genes anotados dentro del QTLR, y el número de SNPs pertenecientes a las regiones sobre cada uno de los Tres umbrales de PFP.

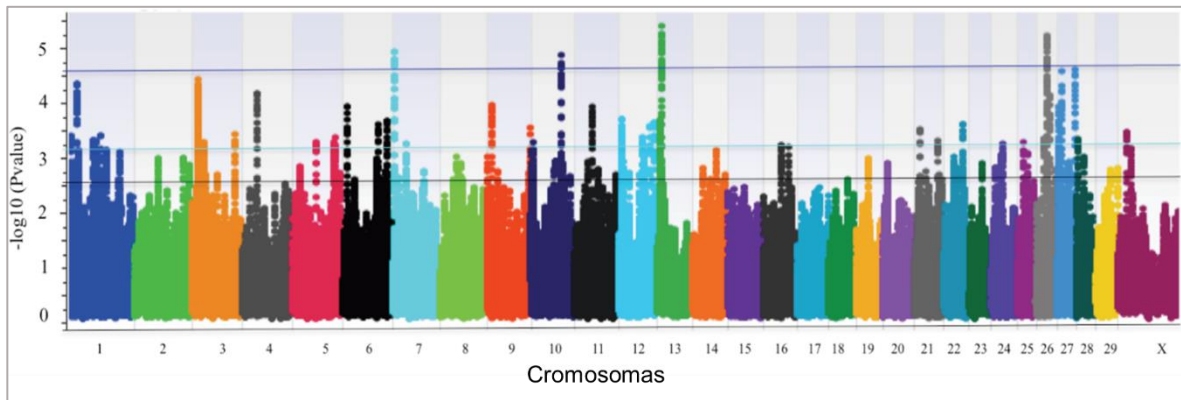


Figura 6. Manhattan para todos los cromosomas. Las líneas horizontales representan el 1% de PFP (azul), el 5% de PFP (azul claro) y los umbrales de 10% de PFP (negro).

172 genes (incluidos 2 miARN y 5 ARNt) se catalogaron en los QTLR utilizando el gen *Bos taurus* Ensembl Anotación del gen de liberación 92 (Apéndice A2). Para todos estos genes (excluyendo miRNA y tRNA), la base de datos DAVID proporciona la información anotada de acuerdo con los términos de las vías GO y KEGG según se informa en el cuadro 4 (valor de P nominal <0.05). Como se muestra en el cuadro 4, la mayoría de los genes se refieren a la respuesta inmune y los términos estructurales. El cuadro 4 reporta: i) la lista de genes anotados en los QTLRs (Lista de genes); ii) la anotación del gen según la clasificación de la base de datos DAVID reportada como genes agrupados y no agrupados.

Cuadro 4. Resultados del análisis de GO y de la ruta (KEGG) para todos los genes incluidos en QTLR significativos (valor de $P < 0.05$).

Término	Conteo	Valor de P	Genes
Procesos Biológicos			
GO:0006334~nucleosome assembly	7	9.42E-05	<i>HIST1H2BB, HIST1H1C, HIST1H1A, H2B, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0006335~DNA replication-dependent nucleosome assembly	3	6.12E-03	<i>H4, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0051290~protein heterotetramerization	3	6.81E-03	<i>H4, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0098792~xenophagy	5	2.27E-03	<i>TMEM39A, SNRPB2, CPA3, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0002230~positive regulation of defense response to virus by host	5	3.68E-03	<i>TMEM39A, SNRPB2, CPA3, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0046627~negative regulation of insulin receptor signaling pathway	3	9.09E-03	<i>PRKCD, KANK1, PRKCB</i>
GO:0042742~defense response to bacterium	4	1.63E-02	<i>STAB1, FCGR1A, PRKCD, TMF1</i>
Componentes Celulares			
GO:0000786~nucleosome	7	1.60E-05	<i>H4, HIST1H1C, HIST1H1A, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0000788~nuclear nucleosome	5	2.47E-04	<i>HIST1H2BB, H2B, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0000784~nuclear chromosome, telomeric region	4	2.30E-02	<i>H4, TNKS, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0030176~integral component of endoplasmic reticulum membrane	4	1.50E-02	<i>PIGG, SARAF, MBOAT4, SLC27A2</i>
GO:0005615~extracellular space	13	3.32E-02	<i>A2M, H2B, HFE, FSTL1, CTSS, OVOS2, ESF1, VEGFC, GPI, CTSK, CPA3, CPB1, SMARCA4</i>
GO:0005788~endoplasmic reticulum lumen	3	4.77E-02	<i>EOGT, SLC27A2, POGLUT1</i>
Función Molecular			
GO:0046982~protein heterodimerization activity	5	7.15E-03	<i>AGTR1, HIST1H2BB, H4, H2B, FOXP1</i>
GO:0042393~histone binding	3	3.67E-02	<i>H4, PRKCB, SMARCA4</i>
Vía KEGG			
bta05322: Systemic lupus erythematosus	12	7.64E-08	<i>HIST1H2BB, H4, CD80, FCGR1A, HIST2H2BF, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
bta05034: Alcoholism	11	4.32E-06	<i>HIST1H2BB, HRAS, H4, HIST2H2BF, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
bta05203: Viral carcinogenesis	8	1.92E-03	<i>HIST1H2BB, HRAS, H4, HIST2H2BF, H2B</i>
bta00514: Other types of O-glycan biosynthesis	3	2.18E-02	<i>ST6GAL2, EOGT, POGLUT1</i>

En la Figura 7, la red de genes obtenida para los genes anotados con STRING, se muestra para las proteínas anotadas *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Los genes que se muestran son solo los de los QTLr que formaban parte de una red. El apéndice A3, reporta el análisis de GO y de la ruta para los genes incluidos en las redes de la Figura 7.

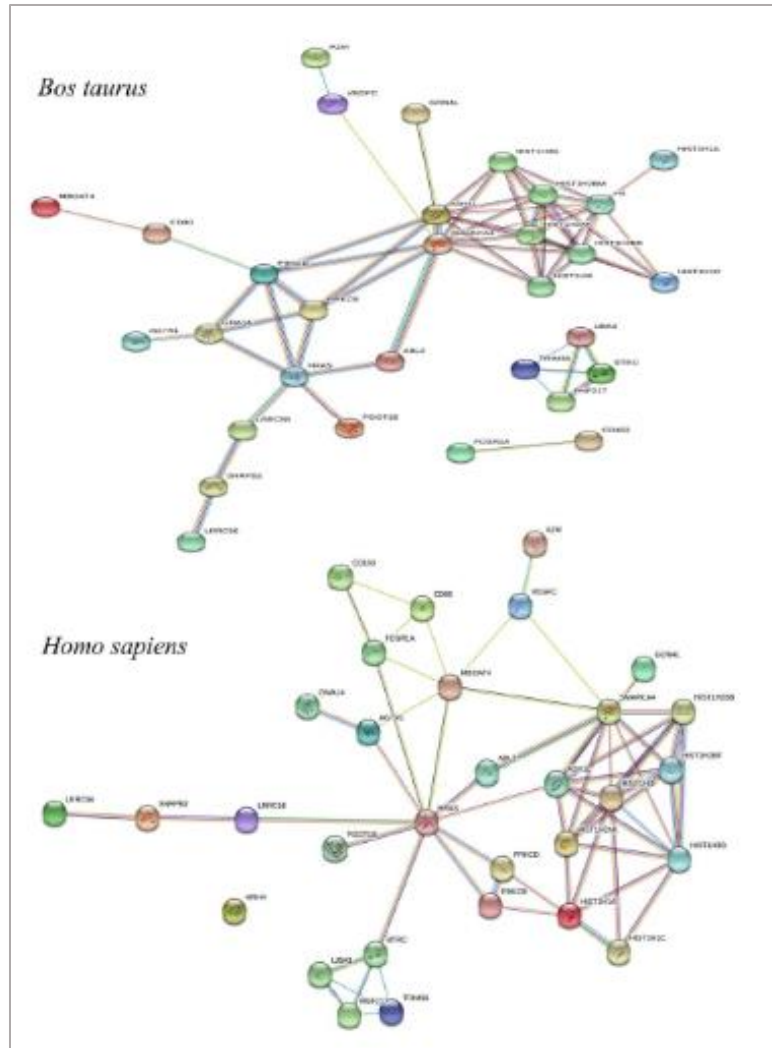


Figura 7. Redes genéticas en el ganado bovino entre las QTLr identificadas con PFP al 10% (bases de datos bovinas y humanas).

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más prevalentes e importantes en la industria ganadera, la vida silvestre y la salud pública. Su erradicación sigue siendo una prioridad para muchos países. Las estrategias actuales para reducir la prevalencia en los rebaños se centran principalmente en la prueba y eliminación de reactores y la vigilancia de

mataderos. Sin embargo, en los países en desarrollo, el éxito de estos programas ha sido parcial debido a la poca sensibilidad de la prueba de la tuberculina y la dificultad para rastrear a los animales infectados identificados en los mataderos. Se han recomendado nuevas estrategias, como la vacunación, ya sea en el ganado o en la vida silvestre o aumentar la resistencia del huésped mediante las prácticas de reproducción. De hecho, estudios recientes han revelado la variabilidad genética que afecta la resistencia a la bTB, lo que sugiere la posibilidad de implementar la selección genómica para esa característica en el ganado.

El GWAS realizado con un diseño de agrupación de ADN selectivo de casos y controles reveló QTLr implicados en la resistencia a bTB que se analizan a continuación de acuerdo con sus umbrales de PFP y por cromosoma.

QTLR_ 1% _PFP

Se identificaron cinco QTLr distribuidos en diferentes BTA (7, 10, 13, 30 y 31), pero el mapeo de tres genes dentro de estas regiones no está involucrado en las rutas metabólicas asociadas a la TBb.

QTLR_ 5% _PFP

BTA1

El QTLr_10 y el QTLr_16 incluyen genes involucrados en la respuesta inmune a la enfermedad. En detalle, la primera región alberga el gen *TIGIT* (inmunoreceptor de células T con dominio Ig y ITIM), un inhibidor de la proliferación de células T, la producción de citoquinas en células T CD4 + y la actividad citolítica de las células NK (Kurtulus *et al.*, 2015). Según lo informado por Joller *et al.*, (2011), el equilibrio alterado entre la activación y las señales inmunes inhibitorias puede resultar en una mayor susceptibilidad a la infección o a la inducción de autoinmunidad.

El gen *NAALADL2* (similar a la dipeptidasa ácida 2 ligada a alfa N-acetilada), cuya función no se conoce bien, se encuentra dentro del QTLR_16. Este gen promueve un fenotipo

pro-migratorio y pro-metastático en el cáncer (Demy *et al.*, 2017), y se asoció recientemente con la enfermedad respiratoria bovina (Lipkin *et al.*, 2016).

BTA3

El gen *TRIM33* (motivo tripartito que contiene 33), localizado en QTLR_27 en BTA 3, está involucrado en la migración de macrófagos y neutrófilos hacia estímulos inflamatorios en tejidos de vertebrados (Demy *et al.*, 2017). Weng *et al.*, (2014) informaron las funciones de *TRIM33* en la regulación transcripcional durante la hematopoyesis, la actividad supresora de tumores en múltiples tejidos, la eritropoyesis y la reparación del ADN.

BTA5

En este cromosoma, el QTLR_37 alberga el gen *CD163* (molécula CD163). Este gen, expresado en monocitos, macrófagos y subpoblaciones de progenitor hematopoyético, está involucrado en la eliminación de los complejos de haptoglobina-hemoglobina al mediar la endocitosis, y previene los efectos tóxicos y oxidativos de la hemoglobina libre. Diferentes mediadores regulan la expresión del gen *CD163*: regulación positiva por glucocorticoides e IL10, y regulación negativa por lipopolisacárido, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa (Fjeldborg *et al.*, 2014).

BTA13

Curiosamente, de 8.1Mb a 10.2 Mb, se encuentran cinco QTLRs (QTLR_95, QTLR_96, QTLR_97, QTLR_98 y QTLR_99): los primeros cuatro ubicados dentro del gen *MACROD2* (dominio MACRO que contiene 2), y el quinto se encuentra entre el final de el gen *MACROD2* y un segundo gen *KIF16B* (Kinesin Family Member 16B) (Figura 4). Los valores individuales de $-\text{Log}_{10}P$ muestran picos muy claros que apoyan la indicación de que en esta región de 2 Mb, el gen *MACROD2* y el gen *KIF16B* pueden jugar un papel en la resistencia a la TB. De acuerdo con la Figura 4, la ubicación de los intrones *MACROD2* y los exones del gen 105 de NCBI refseq, tres exones (líneas verticales azules) se encuentran en el QTLR_3. Además, el gen *MACROD2* es muy largo y su anotación aún necesita validación adicional (National Center for Biotechnology Information). El gen *KIF16B* codifica una

proteína similar a la kinesina que podría estar involucrada en el tráfico intracelular (GeneCards®).

QTLR_10%_PFP

BTA2

El gen *DNER* (que contiene repeticiones EGF delta / notch-like) dentro del QTLR_21 en BTA 2, se encuentra entre los expresados diferencialmente para enfermedades inflamatorias, trastornos del tejido conectivo y enfermedades inmunológicas en bovinos (Newman *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que el nivel de expresión del gen *DNER* disminuye en el ganado de carne de vacuno muy veteado (Clark *et al.*, 2011).

Seis QTLRs albergan siete genes que ya han sido asociados con la susceptibilidad/resistencia a la tuberculosis: QTLR_12 en BTA 1 (*CD80*), QTLR_25 en BTA3 (*CTSS*), QTLR_26 en BTA 3 (*FCGR1A*), QTLR_127 en BTA 23 (*HFE*), QTLR_13 en BTA 25 (*IL21R*) y QTLR_152 en BTA 29 (*ANO9* y *SIGIRR*). Todos estos genes están involucrados en la respuesta inmune contra *Mycobacterium* spp.

Las catepsinas, incluida la catepsina S (*CTSS*), son enzimas proteolíticas que funcionan principalmente en los lisosomas, donde contribuyen a la eliminación de patógenos por su participación en las vías de presentación de antígenos. Pires *et al.*, (2017) demostraron el papel de esta clase de proteínas en el control de *M. tuberculosis* mediante la manipulación de la expresión de catepsina por micobacterias patógenas para favorecer su supervivencia intracelular.

La proteína codificada por el gen *CD80* (molécula CD80), el antígeno de activación de los linfocitos B B7-1, es un receptor de membrana que afecta la reactividad inmunológica de los linfocitos T cuando su expresión disminuye. Además, el *CD80* tiene un papel en la mejora de la inmunidad contra la tuberculosis (Bragina *et al.*, 2016).

La expresión del gen *FCGR1A* (fragmento Fc del receptor Ia de IgG), junto con la del gen BLR1, se ha considerado como un marcador potencial para monitorear la extensión de

la enfermedad y para predecir el resultado del tratamiento en niños afectados por *M. tuberculosis* (Jenum *et al.*, 2016).

Booty *et al.*, (2016) informaron que la citoquina IL-21, producida predominantemente por las células T CD4 + activadas y las células T CD8 +, es un marcador de señalización esencial para la resistencia del huésped a la infección por *M. tuberculosis* a través del receptor IL-21 (IL-21R).

Gomes-Pereira *et al.*, (2008) informaron un aumento en la susceptibilidad a *M. avium* en ratones deficientes en proteína hemocromatosis *HFE*. El *HEF* (regulador de hierro homeostático) es una proteína fundamental involucrada en la regulación de la absorción de hierro celular y la homeostasis del hierro. Los estudios indican que los monocitos con *HFE* mutado han disminuido los niveles de hierro intracelular (Moalem *et al.*, 2004). Además, Wang *et al.*, (2008) demostraron que la hemocromatosis afecta la regulación de la traducción de citoquinas de macrófagos y, en consecuencia, la respuesta inflamatoria.

El gen *ANO9*, también conocido como *TMEM16J* (anoctamina 9), junto con los genes *SIGIRR* y *PKP3* constituyen un complejo polimórfico asociado con la susceptibilidad a la tuberculosis (Horne *et al.*, 2012). El gen *SIGIRR*, también conocido como Toll IL-1 receptor 8, es una proteína reguladora que actúa para inhibir la señalización de ILRs y TLRs (Riva *et al.*, 2012). La *PKP3*, la tercera parte de este gen complejo, mapea 6.2 Kb lejos del final del QTLR_152.

Además, tres QTLR identificados en nuestro estudio (QTLR_43 en BTA6, QTLR_115 y QTLR_118 en BTA 21) se superponen con los encontrados por Richardson *et al.*, (2016) en un estudio sobre la susceptibilidad a la tuberculosis bovina realizado en una población de toros Holstein (ID: 96694; 96508, 96511, 96525, 96514, 96517, 96411, 96549 y 96497). Además, el QTLR_84 en BTA12 y QTLR_139 en BTA26 están incluidos dentro de la "QTL de susceptibilidad de la enfermedad respiratoria bovina (ID: 95663)" y el "QTL de tolerancia al calor (ID: 31198)", respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

Se determinó que los espoligotipos de aislados de *M. bovis* en Jalisco también son los más frecuentes en el resto del país, sin embargo, no hay suficiente evidencia para concluir que el estado de Jalisco es la fuente de infección y diseminación del patógeno por falta de evidencia epidemiológica sobre la movilización del ganado. En relación al estudio de asociación de genoma completo, se revelan nuevos QTLR, y se confirman loci mapeados para la resistencia a tuberculosis. Los nuevos QTLR se ubican en los cromosomas 1, 3, 5, 25 y 29 los cuales albergan genes relacionados con la respuesta inmune del huésped. Las regiones genómicas y los genes identificados en el presente estudio con un enfoque de agrupamiento de ADN selectivo de casos y controles, se asociaron significativamente con la resistencia a la tuberculosis en el ganado. Los hallazgos de este estudio podrían utilizarse para mejorar el conocimiento sobre la respuesta inmune de TBb contra *Mycobacterium bovis*, y así proporcionar la base para mejorar el control genético de esta enfermedad en el ganado.

VII. LITERATURA CITADA

- Abalos, P., Retamal, P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente?. (2004). *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 23:583-594.
- Acevedo, W.K., Vicente, J., Gortazar, C., Hofle U, Fernández de Mera IG, Amos W. (2005). Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol Ecol.* 14:3209-3217.
- Acosta-Salinas, R., Estrada-Chávez, C., Milián-Suazo, F. (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. *Téc. Pecu. Méx.* 47(4):389-412.
- Ameni, G., Aseffa, A., Engers, H., Young, D., Gordon, S., Hewinson, G., Vordermeier, M. (2007). High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 14:1356-1361.
- Amos. W., Driscoll, E., Hoffman, J.I. (2011). Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to Infectious disease? *Proc Biol Sci.* 278:1183-1188.
- Ángel-Marín, P.A., Cardona-Cadavid, H., Cerón-Muñoz, M.F. (2013). Genómica en la producción animal. *Rev Colombiana Cienc Anim.* 5(2):497-518.
- Barandiaran, S., Vivot, M.M., Moras, E.V., Meike, V., Cataldi, A., Zumárraga, M.J. (2011). *Mycobacterium bovis* in swine: Spoligotyping of isolates from Argentina. *Vet. Med. Int.* 979647.
- Bawinek, F. and Taylor, N.M. (2014). Assessment of bovine tuberculosis and its risk factors in cattle and humans, at and around Dilla Town, Southern Ethiopia. *Anim. Vet. Sci.* 2(4):94-100.
- Bermingham, M.L., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Pon-Wong, R., Allen, A.R., McBride, S.H., Ryder, J.J., Wright, D.M., Skuce, R.A., McDowell, S.W., Glass, E.J. (2014). Genome wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity.* 112:543-551.

- Bermingham, M.L., More, S.J., Good, M., Cromie, A.R., Higgins, I.M., Brotherstone, S., Berry, D.P. (2009). Genetics of tuberculosis in Irish Holstein- Friesian dairy herds. *J Dairy Sci.* 92:3447–3456.
- Bhaladhare, A., Sharma, D., Kumar, A., Sonwane, A., Chauhan, A., Singh, R., Kumar, P., Yadav, R., Bagir, M., Bhushan, B., Prakash, O. (2016). Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Vet World.* 9(5):458-464.
- Biffa, D., Bogale, A., Godfroid, J., Skjerve, E. (2012). Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle. *Trop Anim Health Prod.* 44:991-998.
- Blanco, F.C., Shierloh, P., Bianco, M.V., Caimi, K., Meikle, V., Alito, A.E., Caimi, K., Meikle, V., Alito, A.E., Cataldi, A.A., Sasiain-Mdel, C., Bigi, F. (2009). Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiol Immunol.* 53:460-467.
- Bobadilla del Valle, M., Torres-González, P., Cervera-Hernández, M.E., Martínez-Gamboa, A., Crabtree-Ramírez, B., Chávez-Mazari, B. (2015). Trends of *Mycobacterium bovis* isolation and first-line antituberculosis drug susceptibility profile: A fifteen-year laboratory based surveillance. *PLOS Neglected Trop. Dis.* 9(9):e0004124.
- Booty, M.G., Barreira-Silva, P., Carpenter, S.M., Nunes-Alves, C., Jacques, M.K., Stowell, B.L., Jayaraman, P., Beamer, G., behar, S.M. (2016). IL-21 signaling is essential for optimal host resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep.* 7:6.
- Boris, A.D., Stefan, E., Ernst, T.R., Patrick, J.B. (2000). Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int. J. Med. Microbiol.* (290):251-258.
- Bragina, E.Y., Tiys, E.S., Rudko, A.A., Ivanisenko, V.A., Freidin, M.B. (2016). Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. *Infect Genet Evol.* 46:118-123

- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T. (2002). A new evolutionary scenario for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy*.
- Brotherstone, S., White, I.M.S., Coffey, M., Downs, S.H., Mitchell, A.P., Clifton-Hadley, R.S., More, S.J., Good, M., Woolliams, J.A. (2010). Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J Dairy Sci.* 93(3):1234-1242.
- Bukhari, M., Aslam, M.A., Khan, A., Iram, Q., Akbar, A., Naz, A.G., Ahmad, S., Ashfaq, U.A., Aziz, H., Ali, M. (2015). TLR8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern. *Int J Immunogenet.* 42(1):46-51.
- Cantó, G.J., and Olvera, A. (2013). El agente etiológico de la tuberculosis bovina en México: las bases. Milián, F. (ed) Querétaro, Qro. Libro técnico Núm. 13, ISBN: 978-607-37-0106-8. INIFAP-CENIDFA Km. 1 Carretera Colón, Ajuchitlán, Qro.
- Cardenal-Galván., J.A., Rey-Pérez, J.M., Alonso-Rodríguez, J.M. (1992). Tuberculosis bovina. Clínica y lesiones. *Bovis* (47):43-54 ISSN: 11304804.
- Casas, E. (2005). Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.* ISSN: 1022-1301 14(1):24-31.
- Cheng, Y., Huang, C., Tsai, H.J. (2016). Relationship of bovine *NOS2* gene polymorphisms to the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle. *J Vet Med Sci.* 78(2):281-286.
- Clark, D.L., Boler, D.D., Kutzler, L.W., Jones, K.A., McKeith, F.K., Killefer, J., Carr, T.R., Dilger, A.C. (2011). Muscle gene expression associated with increased marbling in beef cattle. *Anim Biotechnol.* 22:51-63.
- Cobos-Marín, L., Montes-Vargas, J., Zumárraga, M., Cataldi, A., Romano, M.I., Estrada-García, I., Gonzalez-Merchand, J.A. (2005). Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern Mexico. *Can. J. Microbiol.* 51(11):996-1000.

- Comstock, G.W. (1978). Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit survey. *Am Rev Respir Dis.* 117:621-624.
- Corner, L. (1993). Bovine tuberculosis: pathology and bacteriology. In Australian standard diagnostic techniques for animal diseases (L.A. Corner & T.J. Bagust, edit.). CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management, East Melbourne, pp. 1-8.
- de Almeida, I.N., Da Silva-Carvalho, W., Rossetti, M.L., Costa, E.R., de Miranda, S.S. (2013). Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6116: Preliminary Study *BMC Research Notes* 6:561.
- de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests. C-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81:190-210.
- Demy, D.L., Tauzin, M., Lancino, M., Le Cabec, V., Redd, M., Murayama, E., Maridonneau-Parini, I., Trede, N., Herbomel, P. (2017). Trim33 is essential for macrophage and neutrophil mobilization to developmental or inflammatory cues. *J Cell Sci.* 130:2797-2807.
- Díaz-Otero, F., Banda-Ruíz, V., Jaramillo-Meza, L., Arriaga-Díaz, C., González-Salazar, D., Estrada-Chávez, C. (2003). Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Mex.* 34;1:13-26.
- Dorronsoro, I., y Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* 30-2:67-84.
- Draper, P. (1998). The outer of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* 15:1253-1261.
- Driscoll, E.E., Hoffman, J.I., Green, L.E., Medley, G.F., Amos, W. (2011). A preliminary study of genetic Factors that influence susceptibility to bovine tuberculosis in the British cattle herd. *PLoS ONE.* 6(4):e18806.

- Ensembl project. Hinxton, Cambridge, United Kingdom.1999.
<http://www.ensembl.org/biomart/martview/502ede1207156b60a738ec6c34389633>.
Accessed 18 Nov 2017.
- Estrada, C., Díaz, F., Arriaga, C., Villegas, N., Pérez, R., González, D. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Méx. Vol.* 35;3:225-236.
- European Variation Archive. Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK. 2017.
<https://www.ebi.ac.uk/eva/?Home>. Accessed 21 Sept 2017
- Farga, V. (2004). La conquista de la tuberculosis. *Rev. Chil. Enferm. Respir.* [online]. 20;2:101-108. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482004000200009>.
- Fernando, R.L., Nettleton, D., Southey, B.R., Dekkers, J.C.M., Rothschild, M.F., Soller, M. (2004). Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics.* 166: 611–619.
- Finlay, E.K., Berry, D.P., Wickham, B., Gormley, E.P., Bradley, D.G. (2012). A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. *PLoS ONE.* 7(2):e30545.
- Fjeldborg, K., Møller, H.J., Richelsen, B., Pedersen, S.B. (2014). Regulation of *CDI63* mRNA and soluble *CDI63* protein in human adipose tissue in vitro. *J Mol Endocrinol.* 53(2):227-235.
- García, J.J., and van Kooyk, Y. (2013). The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. *Trends. Immunol.* 34;10: 482-6.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Hewinson, R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100;13:7877–7882.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>.
- GeneCards®: The Human Gene Database. Weizmann Institute of Science.
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KIF16B>. Accessed 03 Abril 2018.

- Gomes-Pereira, S., Rodrigues, P.N., Appelberg, R., Gomes, M.S. (2008). Increased susceptibility to *Mycobacterium avium* in hemochromatosis protein HFE-deficient mice. *Infect Immun.* 76;10:4713-4719.
- Gros, P., Skamene, E., Forget, A. (1981). Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol.* 127:2417-2421.
- Guilla, A.L., Vázquez, G., Blanco, F.T., Figueroa, G.A., Vázquez, M.S. (2013). RAPD discloses high molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Michoacan, México. *New Microbiol.* 36;4:413-8.
- Gutiérrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens.* 1;1:0055-0061.
- Heaton, M.P., Harhay, G.P., Bennett, G.L., Stone, R.T., Grosse, W.M., Casas, E., Keele, J.W., Smith, T.P.L., Chitko-Mckown, C.G., Laegreid, W.W. (2002). Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome.* 13:272-281. DOI: 10.1007/s00335-001-2146-3.
- Horne, D.J., Randhawa, A.K., Chau, T.T., Bang, N.D., Yen, N.T., Farrar, J.J., Dunstan, S.J., Hawn, T.R. (2012). Common polymorphisms in the *PKP3-SIGIRR-TMEM16J* gene region are associated with susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis.* 205;4:586-594.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.* 19;4:333-341.
- Jenum, S., Bakken, R., Dhanasekaran, S., Mukherjee, A., Lodha, R., Singh, S., Singh, V., Haks, M.C., Ottenhoff, T.H., Kabra, S.K., Doherty, T.M., Ritz, C., Grewal, H.M. (2016). *BLRI* and *FCGR1A* transcripts in peripheral blood associate with the extent of intrathoracic tuberculosis in children and predict treatment outcome. *Sci Rep.* 12:6.
- Joller, N., Hafler, J.P., Brynedal, B., Kassam, N., Spoerl, S., Levin, S.D., Sharpe, A.H., Kuchroo, V.K. (2011). *TIGIT* has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol.* 186;3:1338-1342.

- Kadarmideen, H.N., Ali, A.A., Thomson, P.C., Müller, B., Zinsstag, J. (2011). Polymorphisms of the *SLC11A1* gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Anim Genet.* 42:656-658.
- Kamerbeek, J., Shouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kujiper, 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. *J. Clin. Microbiol.* 35;4:907-914.
- Killinck, K.E., Browne, J.A., Park, S.D.E., Magee, D.A., Martin, I., Meade, K.G., Gordon, S.V., Gormley, E., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E. (2011). Genome-wide transcriptional profiling of peripheral blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis* reveals suppression of host immune genes. *BMC Genomics.* 12:611.
- Kurtulus, S., Sakuishi, K., Ngiow, S.F., Joller, N., Tan, D.J., Teng, M.W., Smyth, M.J., Kuchroo, V.K., Anderson, A.C., (2015). *TIGIT* predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest.* 125;11:4053-4062.
- le Roex, N., van Helden, P.D., Koets, A.P., Hoal, E.G. (2013). Bovine TB in livestock and wildlife: what's in the genes? *Physiol Genomics.* 45:631–637.
- Ledermann, W. (2003). La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. *Rev chil de infec.* 20:48-50.
- Lipkin, E., Strillacci, M.G., Eitam, H., Yishay, M., Schiavini, F., Soller, M., Bagnato, A., Shabtay, A. (2016). The Use of Kosher Phenotyping for Mapping QTL Affecting Susceptibility to Bovine Respiratory Disease. *PLoS One.* 11;4:e0153423.
- Luciani, F, Francis. A.R., Tanaka, M.M. (2008). Interpreting genotype cluster sizes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates typed with IS6110 and Spoligotyping. *Infect. Genet. Evol.* 8;2:182-190.

- Lugones, M., Ramírez, M., Pichs, L.A., Miyar, E. (2007). Apuntes históricos sobre la epidemiología, la clínica y la terapéutica de la tuberculosis en el mundo. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 45;2:53-58.
- Lurie, M.B. (1944). Experimental epidemiology of tuberculosis: hereditary resistance to attack by tuberculosis and to the ensuing disease and the effect of the concentration of tubercle bacilli upon these two phases of resistance. *J Exp Med.* 79:573-589.
- Martínez, N.C.A., Manrique, P.C., Elzo, M. (2012). Cattle genetic evaluation: a historical perception. *Rev Colom Cienc Pecu.* 25;2:293-311.
- Matukumalli, L.K., Lawley, C.T., Shnabel, R.D., Taylor, J.F., Allan, M.F., Heaton, M.P., O'Connell, J., Stephen, S., Timothy, P.L., Sontegard, T.S., Van Tassell, C.P. (2009). Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS ONE.* 4;4:e5350.
- McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., Ryan, F. (2010). An evaluation of MIRU-VNTR analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with RFLP typing. *J. Clin. Microbiol.* 48:4551-4545.
- Meade, K.G., Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., O'Farrelly, C., Costello, E., Keane, J., Zhao, Y., MacHugh, D.E. (2007). Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BMC Genomics.* 2007;8:400.
- Meade, K.G., Gormley, E., Park, S.D.E., Fitzsimons, T., Rosa, G.J.M., Costello, E., Keane, J., Coussens, P.M., MacHugh, D.E. (2006). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear Cells (PBMC) from *Mycobacterium bovis* infected cattle after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD). *Vet Immunol Immunopathol.* 113:73-89.
- Milián, F., Harris, B., Arriaga, C., Thomsen, B., Stuber, T., González, D., Álvarez, G., Santillán-Flores, M.A., Morales-Loredo, A., Estrada-Chávez, C. (2010). Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Mex Cienc Pecu.* 1:403-415.

- Milián Suazo, F., Rubio Venegas, Y., Pérez Guerrero, L. (2013). Epidemiología de la tuberculosis bovina (51-76). En *La tuberculosis bovina en México: las bases*. Querétaro, Qro.: Milián Suazo, F. Libro técnico Núm. 13, ISBN: 978-607-37-0106-8. INIFAP-CENIDFA Km. 1 Carretera Colón, Ajuchitlán, Qro.
- Moalem, S., Weinberg, E.D., Percy, M.E. (2004). Hemochromatosis and the enigma of misplaced iron: implications for infectious disease and survival. *Biometals*. 17:135-9.
- Morales, A., Martínez, I., Carlos, A., Álvarez, G., Álvarez, M., Maldonado, J. (2005). Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Revista científica, FCV-LUZ*. 15;2:103-108.
- Naderi, M., Hashemi, M., Bahari, G. (2016). Lack of Association between rs4331426 polymorphism in the Chr18q11.2 locus and pulmonary tuberculosis in an Iranian population. *Biomed. Environ. Sci.* 29;7:516-20.
- Naranjo, V., Acevedo, W.K., Vicente, J., Gortazar, C., de la Fuente, J. (2008). Influence of methylmalonyl-CoA mutase alleles on resistance to bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Anim Genet.* 39:316-320.
- National Animal Genome Research Program. USDA-NRI. 2003-2018. <https://www.animalgenome.org/>. Accessed 12 Mar 2018.
- National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100125389>. Accessed 03 Abril 2018.
- Negrini, R., Nicoloso, L., Crepaldi, P., Milanesi, E., Colli, L., Chegdani, F., Pariset, L., Dunner, S., Leveziel, H., Williams, J.L., Ajmone-Marsan, P. (2008). Assessing SNP marker for assigning individuals to cattle population. *International Society for Animal Genetic.* 40:18-26.
- Newman, J.H., Holt, T.N., Hedges, L.K., Womack, B., Memon, S.S., Willers, E.D., Wheeler, L., Phillips, J.A., Hamid, R. (2011). High-altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease): Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Pulm Circ.* 1:462-9.

- Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995) Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=725>.
- O'Reilly, L.M., and Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung Dis. J.* 76;1:1-46.
- Ospina, S. (2001). La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Asociación Colombiana de Infectología.* 5:241-249.
- Pérez-Guerrero, L., Milián-Suazo, F., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., Escartín-Chávez, M. (2008). Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Publica Mex.* 50;4:286-291.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci.* 74:1-15.
- Pires, D., Bernard, E.M., Pombo, J.P., Carmo, N., Fialho, C., Gutierrez, M.G., Bettencourt, P., Anes, E. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* Modulates miR-106b-5p to Control Cathepsin S Expression Resulting in Higher Pathogen Survival and Poor T-Cell Activation. *Front Immunol.* 8:1819.
- Plan Estratégico de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina en México, 2008-2012. Dirección general de Salud Animal. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina. Available at: <http://www.senasica.gob.mx/?id=801>.
- Qu, Y., Tang, Y., Cao, D., Wu, F., Liu, J., Lu, G., Zhang, Z., Xia, Z. (2007). Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *In J Hyg Environ Health.* 210:679-689.
- Qu, Hui-Qi QU., Fisher-Hoch, S., McCormick, J.B. (2011). Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis.* 15;5:e305 - e313.
- Qureshi, T., Templeton, J.W., Adams, L.G. (1995). Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* in

- macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 50:55-66.
- Reilly, L.M. and Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1;1:1-46.
- Reyes, J.F., Francis, A.R., Tanaka, M.M. (2008). Models of deletion for visualizing bacterial variation: an application to tuberculosis spoligotypes. *BMC Bioinformatics.* 9;1:496.
- Richardson, I.A., Berry, D.P., Wiencko, H.L., Higgins, I.M., More, S.J., McClure, J., Lynn, D.J., Bradley, D.G. (2016). A genome wide association study for genetic susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23. *Genet Sel Evol.* 48:19-23.
- Rieder, H.L. (2003). Clarification of the Luebeck infant tuberculosis. *Pneumologie.* 57:402-405.
- Riva, F., Bonavita, E., Barbati, E., Muzio, M., Mantovani, A., Garlanda, C. (2012). TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity. *Front Immunol.* 3:322.
- Rivera, P., Giménez, S. (2010). La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria [en línea] [Consultado el: 27 de agosto de 2015] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63615732006>> ISSN.
- Rodwell, T.C., Moore, D., Antic, R. (1988). *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Aust NZ J Med.* 18:701-703.
- Romero, R., Kuivaniemi, H., Tromp, G., and Olson, J. (2002). The design, execution and interpretation of genetic association studies to decipher complex diseases. *Am J Obstet Gynecol.* 187;1299-1312.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J., Wood, P.R. (1990). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Austr Vet J.* 69:1-4.

- Rupp, R., and Boichard, D. (2008). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res.* 34:671-688.
- Salanti, G., and Loannidis, J.P.A. (2008). Hardy-Weinberg Equilibrium. *General Ecology.* 1844-1846.
- Sandoval-Azuara, S., Muñoz-Salazar, R., Perea-Jacobo, R., Robbe-Austerman, S., Perera-Ortiz, A., López-Valencia, G., Braco, D.M., Sanchez-Flores, A., Miranda-Guzmán, D., Flores-López, C.A., Zenteno-Cuevas, R., Laniado-Laborin, R., de la Cruz, F.L., Stuber, T.P. (2017). Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. *Int. J. Infect. Dis.* 63:48-56.
- Santillán-Flores, M.A., Flores, J., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., Suarez-Guemez, F., Espitia, C. (2006). Polymorphism in the PE domain of PE/PE_PGRS sequences in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Vet. Microbiol.* 115;4:364-369.
- Smith, N.H., Dale, J., Inwald, J., Palmer, S., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Smith, J.M. (2003). The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *Proceed. Natl. Acad. Sci.* 100;25:15271-15275.
- Smith, N.H., Gordon, S.V., de la Rúa-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G. (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 4;9:670-681.
- Smith, N.H., and Upton, P. (2012). "Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org". *Infect Genet Evol.* 12;4:873-6.
- Smith, T., Wolff, K. A., and Nguyen, L. (2013). Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current topics in microbiology and immunology.* 374:53–80. doi:10.1007/82_2012_279.
- Strillacci, M.G., Frigo, E., Canavesi, F., Ungar, Y., Schiavini, F., Zaniboni, L., Reghenzani, L., Cozzi, M.C., Samoré, A.B., Kashi, Y., Shimoni, E., Tal-Stein, R., Soller, M., Lipkin, E.,

- Bagnato, A. (2014). A. Quantitative trait loci mapping for conjugated linoleic acid, vaccenic acid and $\Delta 9$ -desaturase in Italian Brown Swiss dairy cattle using selective DNA pooling. *Anim. Genet.* 45:485–499.
- Tabanjin, M.E., Woo, J.G., Martin, L.J. (2009). The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC Proceedings.* 3;7:1-4.
- Tanaka, M.M., and Francis, A.R. (2006). Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103;41:15266-71.
- Tanaka, M.M., and Francis, A.R. (2005). Methods for quantifying and visualizing outbreaks of tuberculosis using genotypic information. *Infect. Genet. Evol.* 5:35-43.
- Tang, C., Reyes, J.F., Luciani, F., Francis, A.R., and Tanaka, M.M. (2008). spolTools: online utilities for analyzing spoligotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Bioinformatics.* 24;20:2414-5.
- Wang, L., Johnson, E.E., Shi, H.N., Walker, W.A., Wessling-Resnick, M., Cherayil, B.J. (2008). Attenuated inflammatory responses in hemochromatosis reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation. *J Immunol.* 15:2723-31.
- Weng, L., Mitoma, H., Tricot, C., Boo, M., Liu, Y., Zhang, Z., Liu, Y.J. (2014). The E3 Ubiquitin Ligase Tripartite Motif 33 Is Essential for Cytosolic RNA-Induced NLRP3 Inflammasome Activation. *J Immunol.* 193;7:3676-3682.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J., Abecasis, G.R. (2005). A note on exact test of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76:887-893.
- Zendejas-Martínez, H., Milián-Suazo, F., Quintín-Cuador, J., Cruz-Bello, G., Anaya-Escalera, A.M., Huitrón-Márquez, G., Casanova, L.G. (2007). Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. *Veterinaria Italiana.* 43;3:629-634.
- Zumárraga, M.J., Vivot, M.M., Marticorena, D., Bernardelli, A., Fasán, R., Lachini, R., Cataldi, A.A. (2009). *Mycobacterium bovis* in Argentina: isolates from cats typified by spoligotyping. *Rev Argent Microbiol.* 41;4:215-217.

VIII. APÉNDICES

8.1 QTLRs identificados en Chrs y en ChrX, y la lista completa de todos los genes mapeados dentro de los QTLR. Las regiones destacadas y resaltadas son aquellas que se encuentran por encima del 5% de los umbrales de PFP y del 1% de PFP.

QTL_ID	CHR	Inicio	Fin	Longitud	Total de SNP por QTLR				SNP lider (rsID)	Genes dentro de QTLR
					Total N.	PFP10% (2.53)	PFP5% (3.17)	PFP1% (4.58)		
1	1	1304562	1363932	59370	18	11	0	0	rs134011154	DNAJC28, TMEM50B
2	1	4026586	4045652	19066	13	11	4	0	rs109811373	KRTAP7-1
3	1	13488340	13610104	121764	18	10	0	0	rs109318600	
4	1	13782669	13917812	135143	19	2	0	0	rs133040804	
5	1	14204261	14252567	48306	18	3	0	0	rs137280353	
6	1	20826405	20997781	171376	26	26	26	0	rs136465876	USP25
7	1	22661125	22775418	114293	19	7	0	0	rs134498590	
8	1	23115580	23196692	81112	36	31	0	0	rs137719887	
9	1	23564627	23667178	102551	15	9	0	0	rs134037994	
10	1	59225919	59386653	160734	33	30	9		rs110920528	DRD3, TIGIT
11	1	63902264	64004080	101816	24	16	0	0	rs136553464	
12	1	64779746	64929822	150076	21	13	0	0	rs43243234	ARHGAP31, TMEM39A, POGlut1, TIMMDC1, CD80
13	1	65643822	65794875	151053	20	16	3		rs43031148	LRRC58, FSTL1
14	1	73052991	73117518	64527	37	2	0	0	rs136208860	XXYL1
15	1	76000691	76062082	61391	11	10	2	0	rs133137010	
16	1	92591521	92785448	193927	50	41	0	0	rs110651607	NAALADL2
17	1	120240981	120445289	204308	20	1	0	0	rs137530439	LOC781192, CPB1, AGTR1, CPA3
18	1	121556035	121716898	160863	19	1	0	0	rs110945331	TRNAC-ACA
19	1	122431430	122474911	43481	23	15	0	0	rs29024142	
20	2	56807237	56825850	18613	16	11	0	0	rs137485996	
21	2	118339066	118398436	59370	16	12	0	0	rs134077742	DNER
22	2	130652581	130759850	107269	20	11	0	0	rs132818112	
23	3	15038246	15343632	305386	111	111	111	0	rs109032486	GON4L, LOC784055, MSTO1, DAP3, LOC101906276, ASH1L
24	3	17882498	17937300	54802	14	6	0	0	rs109742956	IVL, SMCP, LOC786364
25	3	19925850	20043459	117609	14	6	0	0	rs41256309	ARNT, CTSK, LOC101905855, CTSS
26	3	20809678	20906408	96730	20	2	0	0	rs133793098	H2B, HIST1H2AK, HIST2H2BF, LOC788142, FCGR1A
27	3	28952891	29166653	213762	68	66	6	0	rs110086950	TRIM33
28	3	29225576	29269072	43496	16	4	0	0	rs134228290	
29	3	32084085	32169687	85602	33	5	0	0	rs135685694	LOC786961, PIFO
30	3	60905861	60946894	41033	15	5	0	0	rs43339199	
31	3	103789453	103891369	101916	17	14	5	0	rs134753289	
32	4	34811054	34883057	72003	15	15	15	0	rs110668777	
33	5	17343776	17407165	63389	17	9	0	0	rs136710589	
34	5	18586765	18650948	64183	21	6	0	0	rs136391289	

35	5	58682687	58888621	205934	17	13	5	0	rs109827664	LOC787601, LOC787640, LOC787659, LOC100140428, LOC507560, OR6C68, LOC787741, LOC787757, LOC787787, OR6C76, OR6C75
36	5	101175264	101298140	122876	47	42	5	0	rs137226853	OVOS2, LOC506828, A2M
37	5	102222892	102305255	82363	21	18	3	0	rs110972503	CD163
38	5	116001794	116068330	66536	18	5	0	0	rs133599593	
39	6	10720467	10760779	40312	14	14	11	0	rs132955682	
40	6	28838341	28908259	69918	18	2	0	0	rs110158536	
41	6	80476583	80732463	255880	62	33	0	0	rs42896813	
42	6	82381476	82451684	70208	15	8	0	0	rs41654988	
43	6	84869452	85007655	138203	16	7	0	0	rs134872758	CENPC
44	6	85650841	85683005	32164	12	12	7	0	rs134927295	LOC100140029, TMPRSS11E
45	6	91512950	91549572	36622	18	4	0	0	rs42774732	
46	6	104726135	104763230	37095	19	5	0	0	rs43044326	LOC100298890
47	6	107845592	107903912	58320	17	17	11	0	rs135115548	GRK4
48	6	108623334	108740949	117615	32	5	0	0	rs42624901	POLN, NAT8L, PIGG
49	7	3568757	3587977	19220	12	12	12	5	rs136833945	
50	7	16689904	16733735	43831	20	2	0	0	rs110620230	SMARCA4
51	7	33656596	33705245	48649	18	14	1	0	rs135531936	
52	7	76983679	77118545	134866	18	4	0	0	rs42579108	
53	8	34862648	34982329	119681	31	4	0	0	rs42478189	
54	8	42211650	42333050	121400	18	6	0	0	rs42678212	
55	8	44212250	44292707	80457	20	4	0	0	rs43552481	KANK1
56	8	53461897	53643528	181631	16	7	0	0	rs43049982	LOC104969363, LOC100336482, LOC104968682
57	8	53815437	53929147	113710	25	3	0	0	rs41634707	GNA14
58	9	2752933	2791818	38885	13	6	0	0	rs42695697	
59	9	13574584	13620436	45852	15	15	14	0	rs134834443	
60	9	26447854	26480812	32958	20	4	0	0	rs136207066	RNF217
61	9	102593776	102636881	43105	20	5	0	0	rs133117860	
62	9	104919444	104960154	40710	12	12	2	0	rs136568929	WDR27
63	10	3228756	3261109	32353	16	10	0	0	rs42386368	KCNN2
64	10	3952296	4077902	125606	21	8	0	0	rs135943741	TRIM36, PGGT1B, CCDC112
65	10	5390482	5415368	24886	17	14	0	0	rs136013481	HRH2
66	10	6201016	6272200	71184	18	16	1	0	rs133836425	
67	10	7018082	7100125	82043	22	5	0	0	rs109109386	POC5
68	10	7474687	7508600	33913	15	3	0	0	rs135978433	SV2C
69	10	55311677	55374089	62412	22	4	0	0	rs43635236	
70	10	60218145	60523777	305632	15	12	0	0	rs43750820	SLC27A2, ATP8B4
71	10	74265979	74308342	42363	17	8	0	0	rs109882793	SYT16
72	10	74500599	74545991	45392	15	15	15	6	rs110448276	SYT16, MGC148318
73	10	75315290	75510806	195516	46	7	0	0	rs110143019	KCNH5
74	10	78177540	78229376	51836	25	7	0	0	rs110323413	
75	10	78386174	78411687	25513	12	7	0	0	rs110540195	
76	10	82309925	82397429	87504	20	2	0	0	rs132906430	SYNJ2BP, COX16
77	10	95068699	95140079	71380	18	5	0	0	rs42977980	
78	11	32382191	32438618	56427	16	8	0	0	rs137048779	NRXN1
79	11	45384069	45465231	81162	15	15	13	0	rs132951089	ST6GAL2
80	11	57040853	57120276	79423	26	8	0	0	rs109558527	TRNAC-GCA, LOC100139625
81	11	99856348	99931538	75190	32	6	0	0	rs136462854	
82	11	102091479	102204989	113510	38	11	0	0	rs133084668	
83	12	5837583	5873762	36179	22	15	1	0	rs110310667	

84	12	7302652	7416616	113964	27	27	24	0	rs133048122	
85	12	9878413	9930278	51865	17	10	0	0	rs42256666	
86	12	24418683	24494680	75997	19	4	0	0	rs134750202	
87	12	51285361	51359413	74052	27	3	0	0	rs136178759	
88	12	55906047	55961149	55102	15	13	4	0	rs43735273	
89	12	61229440	61473459	244019	45	5	0	0	rs43177113	LOC100139019
90	12	62228153	62319903	91750	23	14	0	0	rs43085766	LOC781157
91	12	74840021	75246806	406785	11	11	5	0	rs134728526	LOC509854, LOC100847383, LOC101906170
92	12	83838362	83874415	36053	14	14	6	0	rs109973403	TRNAF-GAA
93	13	7283523	7386045	102522	21	4	0	0	rs133467315	TASPI
94	13	7410202	7554605	144403	13	8	0	0	rs136921339	ESF1, NDUFAF5
95	13	8347568	8492707	145139	15	14	9	0	rs134887973	MACROD2
96	13	8897823	8946381	48558	16	16	10	0	rs41679483	MACROD2
97	13	9459895	9543500	83605	18	18	11	0	rs110573227	MACROD2
98	13	9813082	9896616	83534	18	11	0	0	rs136583689	MACROD2
99	13	10175391	10246568	71177	27	27	27	25	rs133694898	KIF16B
100	13	10626250	10739137	112887	16	1	0	0	rs133148931	SNRPB2
101	14	27690843	27774924	84081	22	9	0	0	rs109480499	CA8
102	14	44757936	44828842	70906	17	2	0	0	rs110460153	
103	14	47632982	47688254	55272	20	1	0	0	rs135975562	
104	14	56763847	56814467	50620	15	12	0	0	rs109689027	LOC521950
105	14	66696311	66938037	241726	22	1	0	0	rs137680059	VPS13B
106	14	77178901	77349755	170854	31	2	0	0	rs41803313	
107	14	79273648	79315318	41670	15	4	0	0	rs110299481	
108	16	45160222	45267096	106874	33	26	3	0	rs109489540	MIR34A, GPR157, SLC2A5
109	16	61923229	62021571	98342	15	9	1	0	rs109229980	TRNAS-GGA, ABL2
110	18	44882227	45014582	132355	29	2	0	0	rs41880591	KIAA0355, GPI, PDCD2L
111	19	30784868	30822697	37829	23	14	0	0	rs135826377	SHISA6
112	20	10810842	10914469	103627	34	14	0	0	rs135249862	
113	20	11976679	12120408	143729	20	10	0	0	rs110250878	
114	21	10963281	11038991	75710	20	1	0	0	rs135896205	
115	21	11847014	11965876	118862	22	1	0	0	rs109859745	
116	21	14439368	14588509	149141	18	2	0	0	rs137845197	LOC101902856, LOC100138175
117	21	15520116	15548346	28230	13	11	5	0	rs42033044	SLCO3A1
118	21	32109619	32307624	198005	23	5	0	0	rs135757504	ISL2, SCAPER
119	21	58574204	58662617	88413	13	12	4	0	rs41592383	UNC79
120	21	63377756	63521261	143505	18	4	0	0	rs41585292	
121	21	70257462	70382041	124579	17	2	0	0	rs110857469	ASPG, KIF26A
122	22	25282014	25345740	63726	35	15	0	0	rs109834037	CNTN6
123	22	30652758	30732916	80158	21	7	0	0	rs109780010	FOXP1
124	22	32600431	32724871	124440	24	8	0	0	rs109694677	UBA3, TMF1, EOGT, FAM19A4
125	22	48314554	48348037	33483	14	14	7	0	rs42837215	PRKCD, TRNAG-UCC
126	22	48840147	48916958	76811	16	10	0	0	rs133596675	SMIM4, NT5DC2, STAB1, NISCH
127	23	31590170	31701973	111803	18	10	0	0	rs110591378	HFE, HIST1H1C, HIST1H2BB, HIST1H3G, H4, HIST1H3I, HIST1H1A, TRIM38
128	24	9756729	9823020	66291	20	8	0	0	rs134691821	DSEL
129	24	23448982	23550706	101724	23	15	0	0	rs110692086	NOL4
130	24	27621842	27651384	29542	16	12	1	0	rs43073661	TRNAS-GGA
131	25	14523680	14557642	33962	17	9	1	0	rs42063418	ABCC1
132	25	22044319	22084450	40131	27	3	0	0	rs109114447	PRKCB
133	25	25201204	25266159	64955	14	8	0	0	rs41649641	IL21R

134	25	38525087	38605030	79943	18	1	0	0	rs135271887	RSPH10B, PMS2, AIMP2, EIF2AK1, ANKRD61
135	26	21954328	22110190	155862	35	33	20	0	rs42087658	BTRC
136	26	27440728	27505928	65200	16	6	0	0	rs109423850	
137	26	28496105	28574329	78224	26	26	26	18	rs109238880	
138	26	36039746	36079865	40119	12	12	12	0	rs42312936	ATRNL1
139	26	49655897	49785241	129344	25	11	0	0	rs134314701	TRNAC-GCA, GLRX3, MIR2397
140	27	2834288	2847436	13148	13	11	3	0	rs110381464	
141	27	4258596	4291401	32805	16	16	13	0	rs109717329	
142	27	6938210	7002623	64413	32	23	0	0	rs133437413	VEGFC
143	27	10919524	10941983	22459	10	10	10	0	rs136908583	
144	27	24563424	24666608	103184	20	2	0	0	rs109886320	TNKS
145	27	25403611	25537729	134118	19	11	0	0	rs42118979	SARAF, LEPROTL1, MBOAT4, DCTN6
146	27	29650426	29724595	74169	19	11	0	0	rs109075449	
147	27	43106057	43144854	38797	12	12	11	1	rs42940278	
148	27	43291695	43369058	77363	20	5	0	0	rs109267705	
149	28	1942221	1968468	26247	15	12	4	0	rs42862115	
150	28	16523087	16571746	48659	14	11	0	0	rs43292144	LOC100337251
151	29	34306008	34347544	41536	16	9	0	0	rs42165565	
152	29	51072092	51209688	137596	16	5	0	0	rs135730907	LMNTD2, LRRC56, HRAS, PTDSS2, ANO9, SIGIRR
153	x	21763521	21830252	66731	14	14	8	0	rs110568944	MAGEA11
154	x	32924345	33163688	239343	16	11	0	0	rs136433507	TMEM185A

8.2 Artículo 1. Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión

<http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4396>

Revisión de Literatura

Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión **resistance to tuberculosis infection in cattle. Review**

Sara González Ruiz^a

Germinal Jorge Cantó Alarcón^b

Elba Rodríguez-Hernández^c

Susana Flores Villalba^c

Sergio I. Román Ponce^c

Feliciano Milián Suazo^{b*}

^a Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de las ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76230. Tel. 442 192 12 00, ext. 5384. Querétaro, Qro. México. ^b Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, México. ^c Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal-INIFAP. México.

*Autor de correspondencia: feliciano.milian@uaq.mx.

● **Resumen:**

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad crónica del ganado y otras especies animales. Es causada por *Mycobacterium bovis*, y su importancia radica en el riesgo que representa para la salud pública y en las severas pérdidas ocasionadas a la industria ganadera. Actualmente, muchos países tienen programas de control pero de éxito parcial; por lo tanto,

son necesarias nuevas estrategias contra esta enfermedad. En México la prevalencia de tuberculosis bovina se estima en 16 % en ganado lechero, y poco menos de 1 % en ganado para carne; sin embargo, observaciones de campo indican que a pesar de las altas prevalencias en algunos hatos (25-35 %) y la exposición prolongada, la prevalencia nunca llega al 100 %, lo que sugiere que algunos animales son naturalmente resistentes. Considerando que la manifestación clínica de la tuberculosis depende de la interacción de varios factores, es lógico pensar que las variaciones genéticas en el hospedero pueden estar asociadas a resistencia o susceptibilidad. En este trabajo se presenta el resultado de una revisión minuciosa de reportes en la literatura sobre este tema. Se describen de manera resumida trabajos cuyo objetivo es identificar variaciones genéticas entre individuos con y sin la enfermedad, con el propósito de determinar variación genética asociada con resistencia a enfermedades. Se hace mención de los genes frecuentemente relacionados con resistencia. Se concluye que la resistencia a la tuberculosis en el ganado presenta una variación genética que puede ser identificada, medida e incorporada a procesos actuales de selección en ganadería para obtener animales resistentes a la infección.

● **Palabras clave:** Tuberculosis, Resistencia, Genética, Ganadería, *M. bovis*.

● **Abstract:**

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic disease of cattle and other animal species caused by *Mycobacterium bovis*. The importance of bTB is that it represents a risk to public health, and causes economic losses to the livestock industry. Because of this, many countries have established control and eradication programs with partial success. Therefore, the search for new strategies to control this disease is relevant. In Mexico, the prevalence of bTB is estimated in 16 % in dairy cattle and in less than 1 % in beef cattle; however, field studies have proved that in spite of the high prevalence in some herds (25-35 %), and long periods of exposure (3 to 5 yr average), the prevalence never reaches 100 %; this suggests that some animals are naturally resistant to tuberculosis. Considering that clinical manifestation of bTB depends on the interaction of various factors, it is reasonable to think that genetic variations in the host can be associated to resistance to this disease. This review, presents the state of the art in this matter; it describes the results of studies performed in different animal species and humans with the purpose of detecting genetic variation associated with disease resistance. The main genes associated with resistance are described and discussed individually. The conclusion is that genetic variation in cattle is associated with resistance to tuberculosis, and that this variation can be identified, measured, and incorporated into the current process of animal selection in the livestock industry to obtain animals more resistant to infection.

● **Key words:** Tuberculosis, Resistance, Genetics, Livestock, *M. bovis*.

Recibido: 05/03/17.

Aceptado: 23/09/2017.

Introducción

La tuberculosis bovina (TBb) es causada por *Mycobacterium bovis*, patógeno filogénicamente cercano a *Mycobacterium tuberculosis*, el causante de la enfermedad en el humano (TBh). La TBb representa un riesgo para la salud pública, puesto que entre el 3 y el 15 % de los casos de TBh son causados por *M. bovis*^(1,2) y tiene un fuerte impacto económico en la ganadería debido a bajas en la producción, al decomiso total o parcial de animales en rastro y las limitantes en la comercialización del ganado y sus productos. En la actualidad existe interés en muchos países por erradicar la tuberculosis del ganado; sin embargo, a pesar de los múltiples esfuerzos y la enorme cantidad de recursos invertidos, la enfermedad está lejos de ser eliminada. Aunque los países desarrollados han logrado llevar a niveles mínimos la prevalencia en el ganado, en la fauna silvestre la tuberculosis se ha convertido en un problema más difícil de resolver^(3,4).

En el caso de México la prevalencia de la TBb se estima en 16 % para el ganado productor de leche, y en poco menos del 1 % para ganado de carne en la mayor parte del territorio nacional⁽³⁾. En el ganado lechero, el problema se agrava por la baja participación de los productores en actividades de campaña, la cual es menor al 30 %, como consecuencia del pobre comportamiento de las pruebas de diagnóstico *in vivo* y la falta de esquemas de compensación por los animales sacrificados⁽⁵⁾.

Observaciones de campo indican que, a pesar de la alta prevalencia en algunos hatos lecheros, que llega a ser de 25 a 35 %, ésta nunca alcanza el 100 %⁽⁶⁾. Parte de la respuesta a este fenómeno es la alta tasa de desechos sustituidos por nuevos reemplazos, libres de la enfermedad⁽⁷⁾. Se ha observado que algunos animales nunca presentan la enfermedad, a pesar de estar expuestos al patógeno por períodos prolongados (meses e incluso años), lo que sugiere que estos animales pueden ser naturalmente resistentes a la tuberculosis, y quizá a otras enfermedades frecuentes en el hato. Experimentalmente se ha reportado que algunos animales inoculados con altas concentraciones de *M. bovis* no desarrollan lesiones, reforzando la hipótesis de que en estos animales existe una resistencia innata a la tuberculosis⁽⁷⁾. Investigaciones recientes han intentado identificar marcadores genéticos de resistencia a enfermedades, de modo que se puedan incorporar a la mejora genética de animales con fines comerciales. Es así que ya existen marcadores que se usan para mejorar

los índices de producción, reducir el intervalo entre partos, incrementar los pesos al destete y mejorar el porcentaje de grasa en leche, entre otros⁽⁸⁾.

● Factores en la infección de *Mycobacterium bovis* ●

Los factores que influyen en el desarrollo de infecciones son: el hospedero, el patógeno y el ambiente^(9,10). Todos ellos interactúan e influyen en la manifestación de la misma⁽⁹⁾. En el caso de la TBb se ha determinado que existe una heredabilidad significativa para la resistencia del huésped a la enfermedad en el ganado; este parámetro es de gran importancia ya que es uno de los factores que determinarán el éxito potencial de los esquemas de selección en la producción ganadera^(9,11,12). Potencialmente el seleccionar individuos genéticamente resistentes a la TBb, puede contribuir a reducir el problema⁽¹²⁾.

● Estudios de resistencia ●

Tanto en humanos como en animales se han realizado estudios tratando de diferenciar individuos genéticamente resistentes a la tuberculosis. Estudios en gemelos proporcionan una prueba definitiva de que los factores hereditarios son determinantes para el desarrollo de la enfermedad, es decir que existe una mayor tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos *versus* dicigóticos, lo cual indica que la susceptibilidad hereditaria es un factor determinante para el desarrollo de la tuberculosis en los seres humanos⁽¹¹⁾.

En 1926, 251 infantes fueron accidentalmente “vacunados” con una cepa viva virulenta de *M. tuberculosis*, los cuales mostraron una amplia gama de respuestas a la infección, demostrando la existencia de factores innatos que influyen en el desarrollo de la infección⁽¹³⁾. En el caso específico de *M. bovis*, en los años 40s se encontró que dos cepas consanguíneas de conejos mostraron dos fenotipos, uno susceptible y otro resistente a la infección, lo que sugirió que el perfil de la enfermedad desarrollada por los conejos tiene un fuerte componente de herencia genética⁽¹⁴⁾. La diferencia de susceptibilidad de ratones a la cepa vacunal BCG (Bacillus de Calmette y Guérin, vacuna contra la tuberculosis a partir de extracto atenuado de *Mycobacterium bovis*) de *M. bovis* llevó a la identificación del primer locus de susceptibilidad a la TBb, conocido como el gen *Nramp1*⁽¹⁵⁾.

La resistencia genética a enfermedades se ha explorado en varios países⁽¹⁶⁻²⁰⁾, y la información generada se ha implementado ya en programas de mejora genética en el ganado, como ha ocurrido con mastitis⁽²¹⁾. En tuberculosis, algunos estudios han reportado razas de

ganado con diferente nivel de susceptibilidad; la raza cebú demostró ser más resistente que la Holstein y las cruas de Holstein con cebú, a diferencia de las razas europeas que mostraron un patrón de lesiones más severo^(6,22).

Bermingham *et al*⁽²³⁾ estimaron índices de heredabilidad entre 0.14 y 0.18 para la respuesta positiva a la prueba de la tuberculina y la infección confirmada de TBb en ganado HolsteinFriesian. Estudios en ciervo rojo han demostrado diferencias en susceptibilidad y transmisión de la especie, sugiriendo fuertes bases genéticas⁽²⁴⁾; la heredabilidad de resistencia en esta especie fue estimada en 0.48. En venado cola blanca se demostró que los animales con infección eran genéticamente más similares entre ellos que los no infectados⁽²⁴⁾.

En ganado cebú se han reportado dos alelos asociados significativamente con una baja incidencia de TBb en una región microsatélite del gen *Nramp1* (25)⁽¹⁹⁾. De igual manera, en ganado europeo (*Bos taurus*) se encontraron dos microsatélites, BMS2753 y INRA111 fuertemente asociados con una respuesta positiva a la prueba de la tuberculina⁽¹⁸⁾; este último (INRA111), también ha sido asociado con la susceptibilidad de padecer mastitis⁽²⁵⁾.

El escaneo del genoma completo también ha sido utilizado con éxito en el ganado HolsteinFriesian⁽²⁰⁾. Un estudio reveló tres SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) en el cromosoma 22 asociados con susceptibilidad a la TBb⁽²⁰⁾. También se ha encontrado asociación significativa entre el receptor TLR1 en el sitio TLR1-G1596A y la susceptibilidad a la TBb⁽²⁶⁾.

Un estudio reciente que incluye el análisis de diferentes fenotipos (animales reactivos a tuberculina, lesiones visibles y aislamiento de *M. bovis* por cultivo) en la susceptibilidad a TBb, identificó 2 SNP, en los cromosomas 2 y 23, asociados significativamente con diferentes rasgos de susceptibilidad, los cuales proporcionan posibles marcadores para la selección de individuos susceptibles, diferenciándolos de aquéllos con el potencial de resistencia a la enfermedad⁽²⁷⁾.

● Genes asociados a resistencia ●

En estudios de expresión génica se han identificado genes diferencialmente expresados entre animales infectados y no infectados con TBb. Los más frecuentes son: Adam17, Cxcr3, Ier5, Phb2, Cd84, Tbk1, Tlr2, Tlr3, Bcl2, Nfatc4, Ifng, Ifngr1, Tnfsf13b, Kiaa1971, Slamf1, Casp1, Defb10, Ifnar1, Kir3ds1, Myd88, Ptpn2, Stat1, Stat2, Trem1, Tyk2, Tyrobp, Cd83, Ctl4, IL1A, IL8, e IL15⁽²⁸⁻³¹⁾.

Se ha propuesto que algunos otros patógenos, tales como *Brucella abortus*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium paratuberculosis* pueden activar genes similares⁽³²⁾; por lo tanto, al seleccionar animales con resistencia a la TBb, se podría beneficiar también el control de las enfermedades causadas por estos microorganismos. Varios de los genes mencionados, además del Vdr y el Tlr2, también se han asociado a respuesta inmune y a TBh⁽³³⁾.

Cuadro 1: Polimorfismos de nucleótido único (SNP) asociados a resistencia y susceptibilidad a tuberculosis bovina

<i>SNP</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Asociado a:</i>	<i>Referencia</i>
ARS-BFGL-NGS-60576	22	Susceptibilidad a <i>M. bovis</i> . Ubicados en el gen <i>Slc6a6</i> .	Finlay <i>et al.</i> , 2012 ⁽²⁰⁾
ARS-BFGL-NGS-21481	22		
ARS-BFGL-NGS-102776	22		
rs136617760	2	Resistencia a <i>M. bovis</i>	Bermingham <i>et al.</i> , 2014 ⁽¹⁰⁾
rs42494357	13		
rs110465273	13		
rs42494342	13		
rs109809949	13		
rs109042660	13		
rs137562332	13		
rs132841890	13		
Hapmap50596-BTA-121389	23	Resistencia a la infección de tuberculosis bovina	Richardson <i>et al.</i> , 2016 ⁽³⁴⁾
SNP41	12		
BovineHD0100019801	1	Asociado a la susceptibilidad a tuberculosis	Richardson <i>et al.</i> , 2016 ⁽³⁴⁾
SNP137	26	Susceptibilidad a <i>M. bovis</i>	le Roex <i>et al.</i> , 2013 ⁽⁹⁾
SNP144	11		
g.27534932A>C		SNP en el gen <i>TNF-α</i> asociado con el riesgo de tuberculosis bovina	Cheng <i>et al.</i> , 2016 ⁽³⁵⁾
rs55617172	17	Resistencia a <i>M. bovis</i>	Bhaladhare <i>et al.</i> , 2016 ⁽³⁶⁾
<i>Nramp1</i> (<i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i>) codificado por el gen <i>Slc11A1</i>		Asociado significativamente con una baja incidencia de TB	Kadarmideen <i>et al.</i> , 2011 ⁽¹⁹⁾

● Estrategias de estudio de marcadores asociados a resistencia ●

En general, los estudios de asociación genética a la TBb se dividen en dos grandes grupos: 1) de genes candidatos específicos y 2) de genoma completo⁽²⁰⁾. Los primeros estudian SNP u otras variaciones en genes de relevancia biológica. Por ejemplo, se han seleccionado genes relacionados con respuesta inmune o asociados a otras enfermedades. En este tipo de estudios se utiliza un número relativamente bajo de marcadores⁽⁹⁾. Los estudios de genoma completo, por su parte, incluyen la genotipificación de marcadores polimórficos en todo el genoma. Este último procedimiento posee la ventaja de que en el proceso se pueden identificar otros genes que confieran resistencia y no necesariamente estén asociados a respuesta inmune⁽³⁷⁾. No obstante, el procedimiento a seguir depende de la información disponible, y de si se conoce o no el genoma completo de la especie de interés. Aunque el mejor método de estudio es el de "genoma completo", en especies con poca información genómica, el método recomendable será el de identificación de genes específicos⁽⁹⁾.

● Limitantes en el diseño de los estudios de resistencia ●

Los estudios de asociación genética en ganado no están libres de errores. Uno de los principales riesgos es el de encontrar asociación ficticia entre variación genética y resistencia o susceptibilidad a la tuberculosis, por lo que es necesario que toda asociación sea verificada por la replicación de los resultados⁽³⁸⁾. Varios son los factores a considerar en estudios genéticos de susceptibilidad y resistencia. Es vital la precisión del diagnóstico de la enfermedad utilizando las pruebas diagnósticas con la mejor sensibilidad y especificidad para definir casos y controles, es decir, animales verdaderamente enfermos y animales verdaderamente sanos. La identificación de fenotipos debe ser precisa de acuerdo a la pregunta de interés; por ejemplo, en el caso de TBb si se tiene interés en determinar la enfermedad activa, la prueba de la tuberculina no es la mejor opción debido a su baja sensibilidad; el grupo de casos (animales verdaderamente enfermos) debe estar conformado únicamente por animales que presenten lesiones sugestivas de tuberculosis en rastro, y que la enfermedad sea posteriormente confirmada por el aislamiento del *Mycobacterium* por cultivo (prueba de oro)⁽³⁹⁾. El grupo control, por su parte, debe estar conformado por animales que no presenten lesiones sugestivas en rastro y que sean negativos al cultivo. Ambos grupos, casos y controles deben tener exposiciones comparables al patógeno para clasificar correctamente a los fenotipos de susceptibilidad y resistencia, y ser ajustados por otros factores tales como edad, medio ambiente, etc.⁽³⁹⁾. Es muy recomendable que ambos grupos

provengan de los mismos hatos, de los cuales se tenga la tasa de incidencia de la enfermedad⁽³⁹⁾.

El tamaño de la muestra es también importante, y debe ser lo suficientemente grande para asegurar potencia estadística en la detección de variantes con efectos pequeños. El poder estadístico es una función del tamaño de la población de estudio, así como de la frecuencia alélica del SNP y del tamaño de su efecto sobre el fenotipo evaluado. En este aspecto el tamaño de la muestra debe estar en el orden de los cientos y hasta de los miles. La falta de potencia estadística debido a tamaños de muestra inadecuadas es una de las causas más frecuentes de resultados de asociación no reproducibles⁽³⁸⁾.

● Uso de SNP para asociar resistencia a tuberculosis ●

El ADN está compuesto por cuatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina. Cuando se detectan diferencias en una sola base se le conoce como polimorfismo de un solo nucleótido o SNP. La ubicación de los SNP puede estar asociada a genes relacionados con características importantes de los individuos para mejorar diferentes parámetros productivos, por ejemplo, producción y porcentaje de grasa y proteínas en leche, intervalo entre partos y peso al destete, entre otras⁽⁴⁰⁾. Estos marcadores se han utilizado también con éxito en la determinación de identidad genética y del parentesco de los animales⁽³⁵⁾. Incluso, existen estudios que utilizando esta herramienta han identificado ya fenotipos de resistencia y susceptibilidad a enfermedades en ganadería, como es el caso de la mastitis^(8,41,42,43).

En estudios de asociación se comparan las frecuencias alélicas de marcadores específicos entre individuos infectados, enfermos, no infectados y no enfermos. Los estudios de asociación se dividen en aquéllos que tienen un gen como candidato y los que estudian todo el genoma⁽⁹⁾. Dentro de los genes candidatos se investigan los SNP considerados de importancia biológica. En el caso de tuberculosis, generalmente se seleccionan genes implicados en la respuesta inmune o que han demostrado asociación a otras enfermedades infecciosas⁽⁹⁾.

Como ya se mencionó, la estructura genética de los individuos juega un papel importante en el desarrollo de la tuberculosis, tanto para humanos como para animales. El estudiar el patrón de expresión génica de un fenotipo en particular, da lugar a la identificación de genes candidatos, como el *Slc11a1* (Solute Carrier Family 11 Member 1), que modula la actividad de los macrófagos contra parásitos intracelulares durante las primeras etapas de la infección⁽²⁰⁾. En estudios de transcriptómica se identifican las diferencias en los perfiles de expresión génica entre los grupos de animales seleccionados para identificar los marcadores

de infección que garanticen, en conjunto con datos poblacionales, la selección de animales resistentes o susceptibles a la enfermedad⁽⁹⁾.

Los SNP también se han utilizado para determinar asociación de genes con la resistencia a medicamentos utilizados en el tratamiento de la TBh; uno de los principales es la isoniazida (INH). Algunos estudios han indicado que la tasa media de resistencia primaria a INH es del 7.3 %⁽⁴⁴⁾. Con el análisis de 20 genes (FurA, KatG, MabA, InhA, AhpC, Rv0340, IniB, IniA, IniC, SrmR homolog, FabD, KasA, AccD6, FbpC, FadE24, EfpA, Rv1592c, Rv1772, Ndh, NhoA) implicados en la resistencia a INH y secuenciados para obtención de SNP, se encontraron 17 (44.7 %) aislados resistentes a INH, con mutaciones en los genes KatG, MabA y Rv1772. Setenta y seis (76) por ciento de todos los aislados resistentes a INH mostraban una mutación en el gen KatG, confirmando variabilidad genética de individuos resistentes y susceptibles al fármaco, igual que ocurre con las enfermedades⁽⁴⁵⁾.

Los estudios de resistencia a TBb son escasos pero muy informativos. Bermingham *et al*⁽¹⁰⁾, utilizando 592 casos y 559 controles, y marcadores de alta densidad (777,692 SNP), encontraron tres SNP significativamente asociados a resistencia a TBb en los cromosomas 2 y 13. Richardson *et al*⁽³⁴⁾, con 3,240 hatos lecheros irlandeses divididos en casos y controles, de acuerdo a resultados a la prueba de la tuberculina, y asumiendo el mismo nivel de exposición, obtuvieron un SNP (BovineHD0100019801) asociado a susceptibilidad a TBb, localizado en el cromosoma 1, y un SNP (Hapmap50596-BTA-121389) en el cromosoma 23 asociado con resistencia a TBb. Ello demuestra que existen SNP asociados con características de interés, y que pueden tener un efecto protector en las infecciones por *M. bovis*⁽³⁶⁾, o contra la infección de tuberculosis pulmonar causada por *M. tuberculosis* en humanos⁽⁴⁵⁾. Un ejemplo claro es el gen *NOS2*, esencial en la regulación de óxido nítrico, que puede matar o limitar el crecimiento de *M. tuberculosis*⁽³⁵⁾.

M. bovis posee una amplia gama de huéspedes, incluyendo especies de vida silvestre⁽⁴⁾, por lo que estudios en estas especies también son relevantes. En un estudio relativamente reciente donde se estudiaron 198 casos y 670 controles de búfalo africano (*Syncerus caffer*), definidos como positivos o negativos, respectivamente a la prueba de ELISA (Bovigam) y la prueba de la tuberculina, se buscaron marcadores SNP situados en genes relacionados con el sistema inmunológico y el estado de la infección de la tuberculosis. Como resultado, se encontraron los polimorfismos SNP41, SNP137 y SNP144, en los genes *Slc7a13*, *Dmbt1* e *IL1A*, respectivamente, asociados a la susceptibilidad a TBb⁽⁹⁾.

● Variaciones en el número de copias (CNV) ●

La secuenciación del genoma completo está abriendo una nueva era en la gestión de los recursos genéticos en las poblaciones de ganado. El genoma bovino está constituido por 29 autosomas y los cromosomas sexuales, con un tamaño estimado de 3,600 mpb y al menos 22 mil genes⁽⁴⁶⁾. La variación en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés) son segmentos de ADN que miden desde una kilobase hasta varias megabases. Los CNV representan otra fuente de variación genética que puede complementar al SNP en la selección de animales. Los resultados de la genotipificación con SNP están disponibles y pueden ser utilizados para la identificación de CNV⁽⁴⁷⁾. Las variaciones en estas regiones pueden ser por eliminación o duplicación, lo que produce ganancias o pérdidas específicas de ADN genómico, que a su vez resulta en un número anormal de copias de una o más secciones de ADN. Los CNV son segmentos de repeticiones en tándem, que incluyen genes y otros elementos conservados con funciones potenciales, además de la alta tasa de mutación⁽⁴⁸⁾.

Se ha encontrado que los CNV pueden proporcionar una mayor cobertura al SNP del genoma. Esto ayuda en estudios de asociación para la identificación de variabilidad fenotípica⁽⁴⁸⁾. De acuerdo con resultados recientes en humanos, las variaciones estructurales que incluyen a los CNV afectan la expresión génica y están relacionados con la aparición de varias enfermedades; cerca del 12 % del genoma humano está afectado o cubierto por CNV⁽⁴⁹⁾.

Actualmente se cuenta con varios métodos para identificar CNV; uno de ellos es el método aCGH (array comparative genome hybridization), que necesita la secuenciación de todo el genoma para diseñar matrices de mosaicos con oligonucleótidos regularmente espaciados⁽⁵⁰⁾. Dos muestras de ADN genómico se hibridan en la misma matriz de oligonucleótidos y la información de los CNV es relativa a una muestra de referencia. Los paneles de alta densidad de SNP actuales permiten obtener fácilmente información relativa de los CNV⁽⁵¹⁾.

Liu *et al*⁽⁵²⁾ realizaron un análisis sistemático de CNV de 539 bovinos con el chip BovineSNP50, donde identificaron 682 candidatos de CNV con 139.8 megabases, asociados significativamente a inmunidad, producción láctea y reproducción. En ganado Holstein chino se han identificado 367 regiones de CNV, 1.61 % del genoma bovino, con 218 CNV conteniendo 610 genes, considerados de alta función molecular⁽⁵³⁾.

La mayor parte de los reportes sobre CNV y su asociación con susceptibilidad o resistencia a TB son de estudios en genoma humano; los estudios en ganado productor de leche son escasos⁽⁵³⁾; sin embargo, algunos autores reportan que los CNV en ganado son comunes. Algunos estudios de asociación han sido realizados usando aCGH (array comparative genome hybridization)^(52,54), otros con información de genotipos provenientes del BovineSNP50 BeadChip^(40,55). Dos estudios han identificado 855 nuevos CNV en 256

muestras en *Bos taurus coreanae*⁽⁵⁵⁾. En bovinos, con marcadores de mediana densidad (50K SNP), sólo se ha podido identificar una fracción de los CNV, y se espera que con el uso de marcadores de alta densidad (770K SNP) se logre identificar un mayor número de CNV en el genoma bovino⁽⁴⁰⁾.

● Ventajas de los estudios de asociación genética y TBb en México ●

Exceptuando a los países africanos y algunos sudamericanos, una de las ventajas de México sobre los países que han realizado estudios de asociación genética de resistencia a la TBb, es la alta prevalencia de la enfermedad en el ganado para leche (~16 %)⁽³⁾, con tasas de exposición al patógeno muy uniformes y la facilidad de identificar fenotipos de manera precisa. Mientras que en la mayoría de los países la identificación de los casos (animales infectados) y los controles (animales no infectados) se hace a través de diferentes pruebas indirectas, lo que resta precisión al diseño⁽⁵⁶⁾, en México se pueden hacer estudios de resistencia a la TBb con un alto grado de precisión. Dada la prevalencia de la enfermedad en algunas regiones del país se puede identificar perfectamente a los casos por la presencia de lesiones visibles en canales en rastro confirmados por aislamiento del patógeno en el laboratorio, y entonces identificar a los controles, animales provenientes de los mismos hatos que los casos, pero sin lesiones visibles y negativos al aislamiento en el laboratorio. La información sobre tiempo de exposición se puede obtener de los registros de producción de las unidades de producción⁽⁵⁾.

Uno de los problemas fuertes en estudios de asociación entre estructura genética y susceptibilidad o resistencia a la TBb actuales es precisamente la identificación confiable de los fenotipos, algo que en México puede lograrse sin dificultad como se explica en el párrafo anterior, y así poder realizar estudios donde se comparen los genomas de casos y controles para encontrar variantes alélicas que pudieran asociarse con fenotipos de interés⁽¹²⁾.

❖ Conclusiones ❖

Debido a la dificultad de erradicar a la TBb se deben considerar medidas adicionales o complementarias para su control. Una estrategia puede ser la identificación y selección de animales naturalmente resistentes, ya sea por medio de genes específicos relacionados con respuesta inmune o por estudio del genoma completo, mediante la identificación de SNP y CNV asociados. La información actual indica la existencia de bases genéticas asociadas a

resistencia y, por lo tanto, la posibilidad de seleccionar individuos de manera natural. México tiene ventajas sobre países que han realizado estudios de asociación genética con resistencia a la TBb por su alta prevalencia de la enfermedad, las tasas uniformes de exposición y la facilidad de identificar fenotipos de manera precisa. Mientras que en la mayoría de los países la identificación de fenotipos se lleva a cabo a través de pruebas indirectas, en México se pueden detectar por presencia/ausencia de lesiones características de la enfermedad confirmadas por cultivo, incluyendo información sobre tiempo de exposición a través de registros de producción.

● Literatura citada

1. Michel AL, Bengis RG, Keet DF, Hofmeyr M, de Klerk LM, Croos PC, *et al.* Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. *Vet Microbiol* 2010;112(91):91-100.
2. Torres-González P, Soberanis-Ramos O, Martínez-Gamboa A, Chávez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, *et al.* Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(4):e2177.
3. Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública Méx* 2008;50(4):1-6.
4. Milián F, Rubio Y, Pérez L. Epidemiología de la tuberculosis bovina. En: La tuberculosis bovina en México: las bases. Libro técnico INIFAP-CENIDFA, Querétaro, México. 2013;13:51-76.
5. Milián SF, Harris B, Arriaga C, Thomsen B, Stuber T, González D, Álvarez G, *et al.* Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Méx Cienc Pecu* 2010;1(4):403415.
6. Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, *et al.* High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1356-1361.

7. Cantó-Alarcón GJ, Rubio-Venegas Y, Bojorquez-Narváez L, Pizano-Martínez OE, García-Casanova L, Sosa-Gallegos S, *et al.* Efficacy of vaccine formula against tuberculosis in cattle. PLOS ONE 2013;8(19):e76418.
8. Ángel-Marín PA, Cardona-Cadavid H, Cerón-Muñoz MF. Genómica en la producción animal. Rev Colombiana Cienc Anim 2013;5(2):497-518.
9. le Roex N, Koets AP, van Helden PD, Hoal EG. Gene polymorphisms in African buffalo associated with susceptibility to bovine tuberculosis infection. PLOS ONE 2013;8(5):e64494.
10. Bermingham ML, Bishop SC, Woolliams JA, Pon-Wong R, Allen AR, McBride SH, *et al.* Genome wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. Heredity 2014;112:543-551.
11. Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. Am Rev Respir Dis 1978;117:621-624.
12. Allen AR, Minozzi G, Glass EJ, Skuce RA, McDowell SWJ, Woolliams JA, Bishop SC. Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. Proc Royal Society B: J Biol Sci 2010;(277):2737–2745.
13. Rieder HL. Clarification of the Luebeck infant tuberculosis. Pneumologie 2003;57:402405.
14. Lurie MB. Experimental epidemiology of tuberculosis: hereditary resistance to attack by tuberculosis and to the ensuing disease and the effect of the concentration of tubercle bacilli upon these two phases of resistance. J Exp Med 1944;79:573-589.
15. Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. J Immunol 1981;127:2417-2421.
16. Acevedo WK, Vicente J, Gortazar C, Hofle U, Fernández de Mera IG, Amos W. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. Mol Ecol 2005;14:3209-3217.
17. Naranjo V, Acevedo WK, Vicente J, Gortazar C, de la Fuente J. Influence of methylmalonyl-CoA mutase alleles on resistance to bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). Anim Genet 2008;39:316-320.
18. Driscoll EE, Hoffman JI, Green LE, Medley GF, Amos W. A preliminary study of genetic factors that influence susceptibility to bovine tuberculosis in the British cattle herd. PLOS ONE 2011;6(4):e18806.

19. Kadarmideen HN, Ali AA, Thomson PC, Müller B, Zinsstag J. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Anim Genet* 2011;42:656-658.
20. Finlay EK, Berry DP, Wickham B, Gormley EP, Bradley DG. A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. *PLOS ONE* 2012;7(2):e30545.
21. Rupp R, Boichard D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2003;34:671-688.
22. Biffa D, Bogale A, Godfroid J, Skjerve E. Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle. *Trop Anim Health Prod* 2012;44:991-998.
23. Bermingham ML, More SJ, Good M, Cromie AR, Higgins IM, Brotherstone S, *et al.* Genetics of tuberculosis in Irish Holstein-Friesian dairy herds. *J Dairy Sci* 2009;92:3447-3456.
24. Hernández-Marín JA, Cortez-Romero C, Clemente-Sánchez F, Gallegos-Sánchez J, Salazar-Ortiz J, Tarango-Arámbula LA. Risk of transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) in domestic and wild species. *AGROProductividad* 2014;7:65-70.
25. Shulman NF, Viitala SM, de Koning DJ, Virta J, Mäki-Tamila A, Vilkki JH. Quantitative trait loci for Health traits in Finnish Ayrshire cattle. *J Dairy Sci* 2004;87:443-449.
26. Sun L, Song Y, Ria H, Yang H, Hua G, Guo A, *et al.* Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;147:195-201.
27. Raphaka, K, Matika, O, Sánchez-Molano, E, Mrode, R, Coffey, MP, *et al.* Genomic regions underlying susceptibility to bovine tuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *BMC Genet* 2017;18:27.
28. Meade KG, Gormley E, Park SDE, Fitzsimons T, Rosa GJM, Costello E, *et al.* Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear Cells (PBMC) from *Mycobacterium bovis* infected cattle after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD). *Vet Immunol Immunopathol* 2006;113:73-89.
29. Meade KG, Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, O'Farrelly C, Costello E, *et al.* Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BMC Genomics* 2007;8:400.

30. Blanco FC, Shierloh P, Bianco MV, Caimi K, Meikle V, Alito AE, *et al.* Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiol Immunol* 2009;53:460-467.
31. Killinck KE, Browne JA, Park SDE, Magee DA, Martin I, Meade KG, *et al.* Genomewide transcriptional profiling of peripheral blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis* reveals suppression of host immune genes. *BMC Genomics* 2011;12:611.
32. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;50:55-66.
33. Bukhari M, Aslam MA, Khan A, Iram Q, Akbar A, Naz AG, *et al.* TLR8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern. *Int J Immunogenet* 2015;42(1):46-51.
34. Richardson IA, Berry DP, Wiencko HL, Higgins IM, More SJ, McClure J, *et al.* A genome wide association study for genetic susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23. *Genet Sel Evol* 2016;48:19-23.
35. Cheng Y, Huang C, Tsai HJ. Relationship of bovine NOS2 gene polymorphisms to the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle. *J Vet Med Sci* 2016;78(2):281-286.
36. Bhaladhare A, Sharma D, Kumar A, Sonwane A, Chauhan A, Singh R, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Vet World* 2016;9(5):458-464.
37. Amos W, Driscoll E, Hoffman JI. Candidate genes *versus* genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to Infectious disease? *Proc Biol Sci* 2011;278:1183-1188.
38. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;(2):91-99.
39. Stein CM. Genetic epidemiology of tuberculosis susceptibility: impact of study design. *PLOS Pathog* 2011;7:e1001189.
40. Matukumalli LK, Lawley CT, Shnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, *et al.* Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLOS ONE* 2009;4(4):e5350.

41. Martínez NCA, Manrique PC, Elzo M. Cattle genetic evaluation: a historical perception. *Rev Colom Cienc Pecu* 2012;25(2):293-311.
42. Muhasin VN, Kumar A, Rahim A, Sebastian R, Mohan V, Dewangan P, *et al.* An overview on single nucleotide polymorphism studies in mastitis Research. *Vet World* 2014;7(6):416-421.
43. Durán-Aguilar M, Román-Ponce SI, Ruiz-López FJ, González-Padilla E, VásquezPelaéz CG, Bagnato CG, *et al.* Genome wide association study for milk somatic cell score in Holstein cattle using copy number variation as markers. *J Anim Breed Genet* 2016;134:49-59.
44. Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. Drug resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance. *Project Clin Infect Dis* 1997;24(1):121-130.
45. Srinivas V, Reich R, Dou S, Jasperse L, Pan X, Wanger A, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4):1241-1250.
46. Elsik CG, Tellam RL, Worley KC. The genome sequence of Taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science* 2009;324(5926):522-528.
47. Hou Y, Liu G, Bickart D, Cardone MF, Wang K, Kim E, *et al.* Genomic characteristics of cattle copy number variations. *BMC Genomics* 2011;12:127.
48. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, *et al.* Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007;315(5813):848-853.
49. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;444:444-454.
50. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, *et al.* High resolution arrayCGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007;35(3):15.
51. Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SFA, *et al.* PennCNV: An integrated hidden Markov model designed for high resolution copy number variation detection in whole genome SNP genotyping data. *Genome Res* 2007;17(11):1665-1674.
52. Liu GE, Hou Y, Zhu B, Cardone MF, Jiang L, Cellamare A, *et al.* Analysis of copy number variations among diverse cattle breeds. *Genome Res* 2010;5:693:703.

53. Jian L, Jiang J, Yang J, Liu X, Wang J, Ding X, *et al.* Genome-wide detection of copy number variations using high-density SNP genotyping platforms in Holsteins. *BMC Genomics* 2013;14:131.
54. Fadista J, Thomsen B, Holm LE, Bendixen C. Copy number variation in the bovine genome. *BMC Genomics* 2010;11:284.
55. Bae JS, Cheong HS, Kim LH, NamGung S, Park TJ, Chun JY, *et al.* Identification of copy number variations and common deletion polymorphisms in cattle. *BMC Genomics* 2010;11:232.
56. Bishop SC, Woolliams JA. Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Sci* 2014;166:190-198.

8.3 Artículo 2. Genetic diversity of *Mycobacterium bovis* in Jalisco, Mexico: Tracing back sources of infection

academicJournals

Vol. 10(5), pp. 114-122, May 2018
DOI: 10.5897/JVMAH2018.0677
Article Number: 16SD42656818
ISSN 2141-2529
Copyright © 2018
Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/JVMAH>

Journal of Veterinary Medicine and
Animal Health

Full Length Research Paper

Genetic diversity of *Mycobacterium bovis* in Jalisco, Mexico: Tracing back sources of infection

Sara González-Ruiz¹, Susana L. Sosa-Gallegos², Elba Rodríguez-Hernández³, Susana Flores-Villalva³, Sergio I. Román-Ponce³, Isabel Bárcenas-Reyes², Germinal J. Cantó-Alarcón² and Feliciano Milián-Suazo^{2*}

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Mexico.

²Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Mexico.

³Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal-INIFAP, km 1 Carretera a Colón, Ajuchitán, Querétaro, Mexico.

Received 23 February, 2018; Accepted 12 April, 2018

Bovine tuberculosis (bTB) is a disease of cattle that presents risk to public health, causing severe economic losses to the livestock industry and difficulty in eradication because of its complex epidemiology. The aim of this study was to identify relationships between *Mycobacterium bovis* strains from cattle in the State of Jalisco, and those of other States of México. Molecular fingerprints of 337 *M. bovis* isolates from Jalisco, and 1152 from other States of México were included in the study. Isolates were obtained from tubercles between 1997 and 2015. Evolutionary relationship was determined throughout spoligoforest (www.eml.unsw.edu.au/spoltools/). From 337 isolates from Jalisco, 59 spoligotypes were obtained, ten of them included 48% of all isolates in the state. Five spoligotypes were common to beef and dairy cattle. The molecular analysis showed eight clusters in a phylogenetic tree: one with three subclusters of nine isolates each, all from dairy cattle; four with two isolates, including dairy and beef cattle. All spoligotypes from Jalisco have been reported in other states, four of the most frequent ones: SB0673, SB0971, SB066S and SB0140, were the same as in other states. The most frequent spoligotypes of *M. bovis* found in Jalisco were also the most frequent ones in other parts of Mexico. However, there is no evidence to conclude that Jalisco is the source of infection to other states since no information on movement and destination of cattle could be documented.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, cattle, Jalisco, molecular epidemiology.

INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (bTB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which also includes *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M.*

bovis, *M. plimipedi*, *M. caprae* and *M. microti*. Bacilli in this group are 99.9% genetically similar at the nucleotide level with identical 16S rRNA sequences (Boddinghaus et al., 1990; Sreevatsan et al., 1997) but with different host

*Corresponding author. E-mail: feliciano.milian@uaq.mx. Tel: 442 192 12 00. Ext: 5384.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

preferences; *M. bovis* has the broadest host range, causing disease in a wide range of mammals, including humans (O'Reilly and Daborn, 1995; Bilschak et al., 2015). The proportion of cases due to *M. bovis* in humans in the last two decades has been variable, ranging from 0.5 to 13% depending on the study population, and it is estimated that nearly 10 million people are affected by tuberculosis worldwide every year (Müller et al., 2013; Olea-Popelka et al., 2017; Perea-Razo et al., 2017). Transmission to humans occurs by inhalation of infectious droplets from infected cattle, and consumption of contaminated unpasteurized dairy products (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

bTB causes direct and indirect economic losses to the livestock industry, infected animals have poor production performance, die or are culled prematurely. Free trade of animals and animal products in affected areas is prohibited, especially for exportation (Bawinek and Taylor, 2014; El-Sayed et al., 2016).

Like many countries, Mexico has a national program for the control and eradication of tuberculosis (NOM-031-ZOO-1995). This program is based on tuberculin testing and culling of reactors; however, after about two decades, the success has been partial, prevalence in beef cattle has been reduced to low levels (~0.5%) in 85% of the national territory, but in dairy cattle prevalence remains in about 16% (Plan Estratégico de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina en México, 2008-2012; Millán-Suazo et al., 2016). Poor participation of dairy farmers in the program, who are not willing to eliminate reactors is one of the main reasons. Nevertheless, the elimination of bTB in Mexico is a high priority task.

Another reason that has hampered the complete success of the bTB program in Mexico, and in other developing countries is the lack of a good system to trace back sources of infection and the indiscriminate movement of animals. Fortunately, in the last ten years, the arrival of molecular techniques to genotype strains of *M. bovis* has enormously supported epidemiological studies focused on detecting areas of risk. Because of simplicity and the low levels of DNA required in the analysis, spoligotyping is one of the methods most frequently used for studying genetic relationship between strains, and the spatial and temporal distribution of *M. bovis* (Kamerbeek et al., 1997; Rodríguez-Campos et al., 2011).

Spoligotyping detects presence or absence of spacers of the Direct Repeat (DR) locus in the *M. bovis* genome (Supply et al., 2006). The DR region contains a large number of DR's of 36 bp interspersed by spacers from 35 to 41 bp in length. These repeats are present in isolates of the *M. tuberculosis* complex only, and it has been shown that this region is variable (Kamerbeek et al., 1997). Presence or absence of DR's allows phylogenetic analysis to determine genetic relationship between individual or groups of strains (Acosta-Salinas et al., 2009;

Jagielski et al., 2014).

Molecular genotyping suggests that isolates with similar fingerprints are epidemiologically related and differ from those epidemiologically unrelated (Maslow and Mulligan, 1993); however, the desirable characteristic for typing is related to its stability within the strain and its diversity within the species (Kamerbeek et al., 1997; Zhou et al., 2011; Kim et al., 2017). Strains with the same spoligotype are assumed to be individuals recently derived by clonal replication from a single ancestral cell; therefore, epidemiological related strains should have higher genetic similarity than those not related (Rodríguez-Campos et al., 2011; Millán et al., 2016). Furthermore, spoligotyping has been used successfully in epidemiological studies in many countries (Gibson et al., 2004; Parra et al., 2005; Duarte et al., 2010; Rodríguez et al., 2010; Skuce et al., 2010; Ruettinger et al., 2012; Mwakapuja et al., 2013).

Bacilli of the *M. tuberculosis* complex are clonal, exchange of DNA between individual does not exist. Therefore, it is widely accepted that spoligotypes provide enough information to estimate recent evolution events to perform phylogenetic analysis for epidemiological purposes (Supply et al., 2006), and together with MFRU-VNTR has been recognized as the new gold standard for molecular epidemiological investigations of TB (Jagielski et al., 2014). Currently, there are many reports about the spatial and temporal distribution of *M. bovis* in different geographic areas around the world; however, no information on the role of specific geographic areas in the dissemination of bTB is available.

Therefore, the objective of this study was to use spoligotyping patterns to better understand the population structure of *M. bovis* in cattle in Jalisco, and to evaluate the role of this state as a source of infection for other regions in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Isolates data

Data from a total of 337 *M. bovis* isolates from cattle in the State of Jalisco, and 1,152 from other states in Mexico between 1997 and 2015 were included in the study. Isolates were obtained directly from bTB suspicious tissue collected from carcasses in slaughterhouses, and cultured in Stonebrink and Lowenstein-Jensen with pyruvate. Briefly, tissue samples were first decontaminated with 1:1000 solution of sodium hypochlorite and then macerated and decontaminated with a 10% solution of hydrochloric acid. DNA for spoligotyping was obtained by the CTAB-chloroform method, according to de Almeida et al. (2013). Briefly, a total of 500 µL of suspended colonies in TE 1X buffer was transferred into lysozyme (10 mg/ml) and incubated at 37°C for 1 h. Then, proteinase K and sodium dodecyl sulfate 10% were added, and the suspension was incubated at 65°C for 30 min. Subsequently, a solution consisting of a mixture of NaCl and CTAB (NaCl 5 M and CTAB 10%) was added, and the suspension was incubated for 30 min at 65°C. DNA was then extracted with chloroform/isoamyl alcohol (24:1). The supernatant was transferred to a new tube and isopropanol was added. The suspension was

Table 1. The most frequent *M. bovis* spoligotypes in Jalisco and other States of Mexico, by breed.

State	Breed	Spoligotype (SB)										Other	Total
		0873	0871	0888	0140	0145	0121	0883	0288	1118	0118		
Jalisco	Dairy	35	14	30	15	18	10	10	8	7	9	163	319
	Beef	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	5
	Unknown	2	0	0	0	0	0	0	1	2	1	7	13
	Total	37	14	30	16	18	10	12	9	9	10	172	337
Other States	Dairy	148	60	67	75	66	70	27	21	13	11	284	842
	Beef	8	19	13	4	0	0	7	5	10	1	24	91
	Unknown	22	33	13	14	10	4	4	7	10	3	99	219
	Total	178	112	93	93	76	74	38	33	33	15	407	1152
Grand total		215	126	123	109	94	84	50	42	42	25	579	1489

kept at -20°C for 2 h and centrifuged for 15 min at 14,000 g. The pellet was washed with 500 µL of 70% ethanol and centrifuged for 5 min at 14,000 g, and 50 µL of TE buffer was added.

Spoligotyping

Spoligotyping was performed according to Kamerbeek et al. (1997). The DR region was amplified using the primers DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC, 5' biotinylated) and DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC). The amplified product was hybridized to a nylon membrane to which 37 spacer sequences from *M. tuberculosis* H37Rv and 6 spacer sequences from *M. bovis* BCG were covalently bound (Isogen Bioscience BV, Maarsse, The Netherlands). For the detection of hybridizing DNA, chemiluminescent ECL detection system (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) was used, followed by exposure to X-ray film (Kodak) for 45 min. Spoligotypes were named according to the website *M. bovis* spoligotype database (www.mbovis.org).

Phylogenetic analysis

Spoligotyping data were converted to binary character data (absent=0 and present=1) for the 43 probe hybridization positions. Genetic relationship between spoligotypes was determined by using the algorithm MIRU-VNTRplus available in www.miru-vntrplus.org. Evolutionary relationship was determined throughout spoligoforest in the spoTools webpage (www.emi.unsw.edu.au/spoTools/) for all spoligotypes clustering at least three isolates. Spoligoforest provides an evolutionary genetic tree showing the most probable relationship of all the spoligotypes in the data set (Reyes et al., 2008). This algorithm uses a model that considers mutations by irreversible deletions of spacers and assigns probabilities to the lengths of these deletions. The number of isolates in the cluster determines the size of each node in the tree. Edges between nodes reflect evolutionary relationships between spoligotypes with arrowheads pointing to descendants. Spoligotypes from Jalisco were matched to spoligotypes from other States of Mexico to determine the level of dissemination of *M. bovis* in the country.

RESULTS

Out of 337 isolates from Jalisco, a total of 59

spoligotypes were obtained, ten: SB0673, SB0971, SB0669, SB0140, SB0145, SB0121, SB0663, SB0269, SB1116, and SB0119 included 48% of all isolates from Jalisco; grouping between nine and 37 isolates. Ten spoligotypes grouped between two and three isolates, and 39 were orphans. When comparing spoligotypes from Jalisco with those from other states, it was found that the most frequent spoligotypes in Jalisco were also the most frequent ones in other States of Mexico. Five spoligotypes from Jalisco were common to beef and dairy cattle, suggesting related strains between these two breeds (Table 1).

Out of the 1,152 isolates from states other than Jalisco, a total of 159 spoligotypes were obtained, which included 56% of all isolates in the data set, 98 were orphans. The ten most frequent spoligotypes in Jalisco were also the ten most frequent ones in other parts of Mexico; two hundred and sixty-six were not found in the www.mbovis.org data set. From all the isolates in the data set, 1,161 came from dairy, and 96 from beef cattle; the rest had not information for this variable (Table 1).

Figure 1, shows the phylogenetic tree of spoligotypes from Jalisco, containing groups of at least three isolates each. Eight clusters were formed in this tree: one with three subclusters with nine isolates each, all from dairy cattle. Four with two isolates, including dairy and beef cattle, and three with one subcluster; one including an isolate from beef cattle. Isolates from other states matching spoligotypes from Jalisco are described in Table 2. All spoligotypes from Jalisco have been reported in other States, four of the most frequent spoligotypes in Jalisco: SB0673, SB0971, SB0669 and SB0140, were also the most frequent ones in other states. Some spoligotypes are common to dairy and beef cattle, suggesting related strains of bTB between these two breeds.

Figure 2 shows the spoligoforest hierarchical layout of isolates from Jalisco, where the continuity of lines indicates the weight of the hypothetical evolutionary

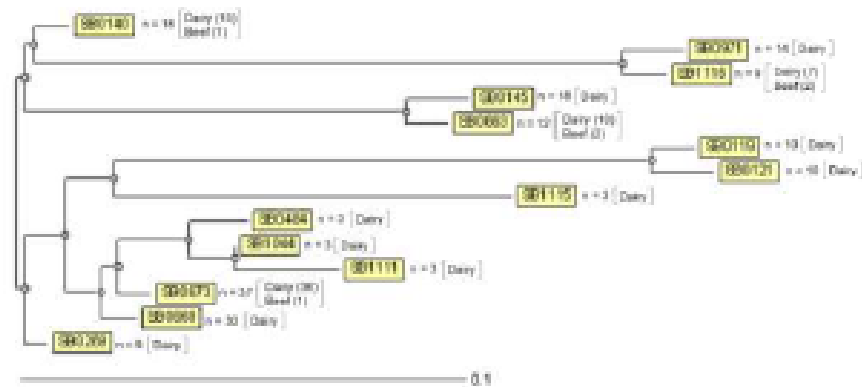


Figure 1. Phylogenetic tree of *M. bovis* isolates obtained from cattle in the State of Jalisco. Number in brackets indicates the number of isolates per breed.

relationship between spoligotypes; continuous line indicates stronger relationship. The spoligoforest shows two trees with connected components. The biggest tree, the one with the largest number of branches, is rooted by strain SB0140, suggesting this as the oldest strain in the tree.

A total of 141 isolates descended from SB0140, in four clearly defined clusters with 9 to 37 isolates each. The hypothetical evolutionary relationship between spoligotypes SB0140 and SB0673, the spoligotype with the largest cluster in the data set is strong, suggesting a small number of changes in the DR region sequence. Spoligotype SB0669, the second largest cluster, has a strong relationship with spoligotype SB0673 but is not directly connected to spoligotype SB0140, suggesting a new evolutionary route.

Spoligotypes SB0145, SB0269 and SB0971 all directly descended from SB0140. SB0145 and SB0971 have their own evolution route since other spoligotypes are derived from them (SB0663 and SB1115, respectively). From the second tree, rooted by spoligotype SB0121, only one lineage is formed, giving origin to strain SB0119.

Figure 3 shows the spoligoforest hierarchical layout of isolates from states apart from Jalisco in Mexico. Like the Jalisco's spoligotypes, the other States spoligoforest shows two separated trees, originating also from SB0121 and SB0140. The only big difference between the two spoligoforests is the presence of spoligotype SB0971 with a large number of isolates in a separated branch, suggesting a new genetic line. As before, spoligotype SB0140 seems to be the older spoligotype in the country.

DISCUSSION

Spoligotypes SB0673 and SB0669 were the most

frequent spoligotypes in Jalisco. These spoligotypes SB0971 and SB0669 were also the most frequent ones in the rest of the country; however, this fact does not necessarily mean that Jalisco is the source of infection since no epidemiological evidence connecting strains from different sources in Mexico could be obtained. It is known that Jalisco is an important source of dairy replacements to other regions in Mexico under especial circumstances; however, this could not be confirmed due to the lack of information on movement of cattle. It is known from personal communication that Jalisco acted as a source of dairy heifers for other regions in the years 2003 to 2006, when Mexico closed the border to the importation of cattle from the United States (US) and Canada because of the bovine spongiform disease outbreak; the US and Canada are the main sources of replacements for dairy in Mexico. It was not known, however, what the distribution of *M. bovis* strains in the country was before that event, for comparison.

Beef and dairy cattle are maintained under different conditions in Mexico. Dairy cattle are raised in close intensive settings with a large number of cattle per square meter; in some regions it is possible to observe 10,000 cattle in a single unit operation. On the contrary, beef cattle are raised in open extensive areas with a low number of cattle per hectare. Because of this, the prevalence of bTB in dairy cattle is higher =16% (range 0 to 40%) than in beef cattle =0.5% (range 0 to 1%) (Plan Estratégico de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina en México, 2008-2012). Therefore, infected dairy populations are a risk to bTB-free or bTB-low prevalence areas of beef cattle. Fourteen of the isolates from beef cattle had spoligotypes SB0673 or SB0669, two of the most frequent spoligotypes in dairy cattle, suggesting transmission between breeds. From the epidemiological point of view, this is relevant because transmission from

Table 2. Frequency and relationship of *M. bovis* isolates from Jalisco and other States of Mexico by breed.

Spoligotypes from Jalisco	Number of isolates	State (number of isolates by State for States other than Jalisco)		Unknown
		Dairy	Beef	
SB0673	182	Ags (9), BC (3), Chih (6), Coah (16), EdoMex (17), Gto (9), Hgo (17), Gro (66), Sin (2), SLP (1), Ver (1), Zac (1).	Chih (1), Dgo (1), Gto (2), Zac (4).	Ags (7), Coah (2), Col (1), Gro (1), Mich (1), Mor (7), Gro (7).
SB0971	109	Ags (6), BC (1), Chis (1), EdoMex (10), Gto (8), Hgo (8), Mich (1), Gro (22), SLP (1), Ver (1).	Gto (1), Mich (1), Gro (15), Son (1), Ver (1).	Ags (8), EdoMex (7), Gto (3), Gro (1), Mor (1), Nay (2), Gro (7), SLP (2), Son (1), Zac (1).
SB0669	173	Ags (11), BC (1), Coah (10), Col (1), Dgo (3), EdoMex (18), Gro (2), Gto (5), Hgo (9), Gro (4), SLP (2), Tlax (1).	Gto (2), Mich (1), Nay (8) y Zac (2).	Gro (2), BL (1), Pueb (4), SLP (3), Son (1), Zac (1).
SB0140	90	Ags (10), Chih (8), Coah (2), Edo Mex (5), Gto (3), Hgo (9), Mich (3), Gro (33), Zac (2).	Gto (1), Mich (1), Zac (2).	Ags (6), EdoMex (2), Gto (2), Mor (1).
SB0145	74	Ags (4), BC (14), EdoMex (16), Gto (4), Hgo (5), Gro (20), Ver (2), Zac (1).	—	Ags (2), Nay (1), Gro (2), Sin (2), Ver (1).
SB0121	74	Ags (1), BC (1), Chih (29), Coah (2), EdoMex (3), Hgo (20), Gro (14).	—	Mich (3), Nay (1).
SB0663	37	Ags (5), BC (10), Chih (1), Dgo (1), Edo Mex (3), Gto (2), Gro (4), Zac (1).	Mor (1), Nay (4), Son (1) y Ver (1).	Sin (1), Son (1), Ver (1).
SB1116	33	Ags (5), Col (1), Dgo (1), Edo Mex (2), Mich (1), Gro (2), Zac (1).	Gro (1), Nay (1), Ver (8).	Pue (2), SLP (3), Sin (1), Tamps (2), Ver (2).
SB0269	33	Ags (5), Coah (1), Dgo (1), Edo Mex (2), Gro (1), Hgo (3), Gro (2), Ver (6).	Camp (3), Gto (1), Sin (1).	Col (1), Nay (1), Pue (2), SLP (3).
SB0119	14	Chih (4), Coah (2), Dgo (1), Hgo (3) y NL (1).	Gto (1).	Col (1), Sin (1).
SB0484	10	Edo Mex (3), Gto (1), Hgo (3) Gro (1), SLP (2).	—	—
SB1044	9	Edo Mex (3), Hgo (2), Gro (2).	—	Gro (1), Zac (1).
SB1115	1	Ags (1)	—	—
SB1111	1	Edo Mex (1)	—	—

dairy to beef cattle might jeopardize the goals of the national program to eradicate bTB, and the exportation of calves, an important source of currency for Mexican farmers. In this study, it is not known however if beef animals found infected are from cattle for beef operations or from dairy operations, where sometimes, beef bulls are used for breeding cows with reproductive problems, and beef calves are kept for fattening in the same farm.

Even though clustering of isolates occurred, the diversity of spoligotypes is wide. This agrees with previous reports (Cobos-Marin et al., 2005; Santillán-flores et al., 2006; Reyes et al., 2008; Pérez-Guerrero et al., 2008; Bobadilla-del Valle et al., 2015; Sandoval-Azuara et al., 2017), where in spite of studying samples from different and specific regions of Mexico, the diversity of strains has been evident, suggesting an intense and continuous exchange of animals, and new genetic

lines emerging as a consequence of the high prevalence of bTB in dairy cattle.

The spoligoforest demonstrates all possible relations of spoligotypes under the assumption of spoligotype mutation, with genetic instability ranging from 10 to 20 years (Brosch et al., 2002; Gutiérrez et al., 2005; Smith et al., 2006). In the data set, the largest root of the tree was spoligotype SB0140. Spoligotype SB0140 has infected cattle, deer, badgers and people in

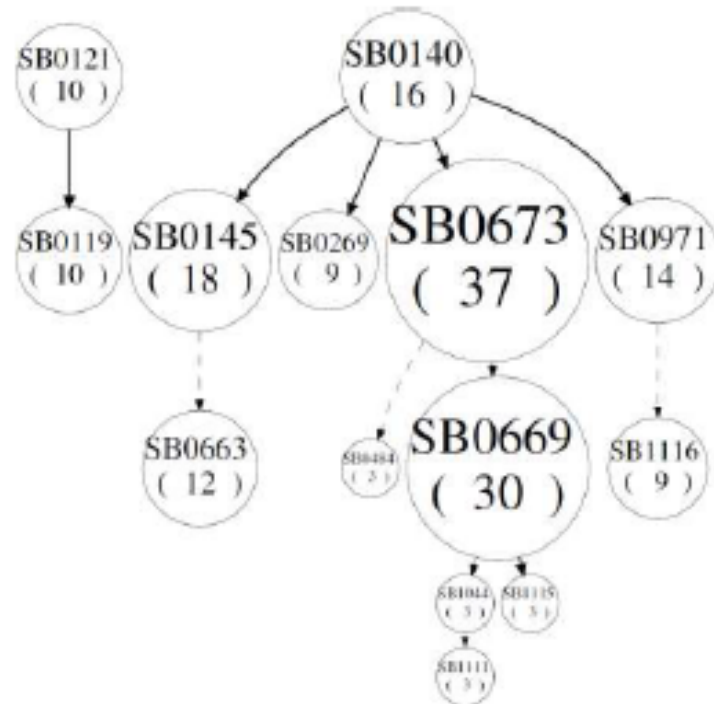


Figure 2. Spoligoforest of *M. bovis* spoligotypes obtained from cattle in Jalisco, Mexico. Nodes are labeled with the SB identifier as indicated in *mbovis.org*; numbers in parenthesis indicate cluster size. Lines between nodes reflect hypothetical evolutionary relationships among spoligotypes with arrows denoting descent. Continuous lines indicate stronger relationship. Source: <http://spoltools.emi.unsw.edu.au/>

Ireland (de la Rúa-Domenech et al., 2006; McLemon et al., 2010), and cattle in the United Kingdom (de la Rúa-Domenech et al., 2006; McLemon et al., 2010). It has also been reported as the most frequent spoligotype in pigs (Barandiaran et al., 2011), cattle and cats in Argentina (Zumárraga et al., 2009), and humans in the United States (Rodwell et al., 2008) and Mexico (Bobadilla-del Valle et al., 2015).

Spoligotype SB0140 has been studied profoundly in the United Kingdom (Smith et al., 2003). It was concluded that the frequency of strains with SB0140 in that country cannot be explained by random drift without selection. It has been concluded that some genotypes increase in number in a specific region in a "clonal expansion" by selection of favorable mutations when some cells find new host species or new geographical regions. In Mexico, it is believed that both situations are possible at least for the most frequent spoligotypes: selection of favorable mutations due to the high prevalence of *M. bovis* in the population and ecological opportunity by the

indiscriminate movement of animals between regions.

Clusters with similar or highly similar *M. bovis* spoligotypes are considered the result or recent transmission, and that the orphans arise from migration or reactivation of acquired infections (Luciani et al., 2008). However, other factors may be involved in that clustering, that is, sampling and the mutation rate of the molecular marker used in fingerprinting (Tanaka and Francis, 2005). In the current study, both clustering and a high frequency of orphan spoligotypes occur. Clustering might well be a consequence of the conditions in which dairy cattle are maintained, in high density populations and orphans, the result of the indiscriminate movement of animals between regions or the high prevalence of the disease, which gives rise to new genetic lineages.

Something that is clear from the current study is that molecular information itself is not enough to explain the epidemiology of a disease. In the present study, no data on movement of animals from Jalisco could be obtained in spite of intensive search of data, and this is clearly a

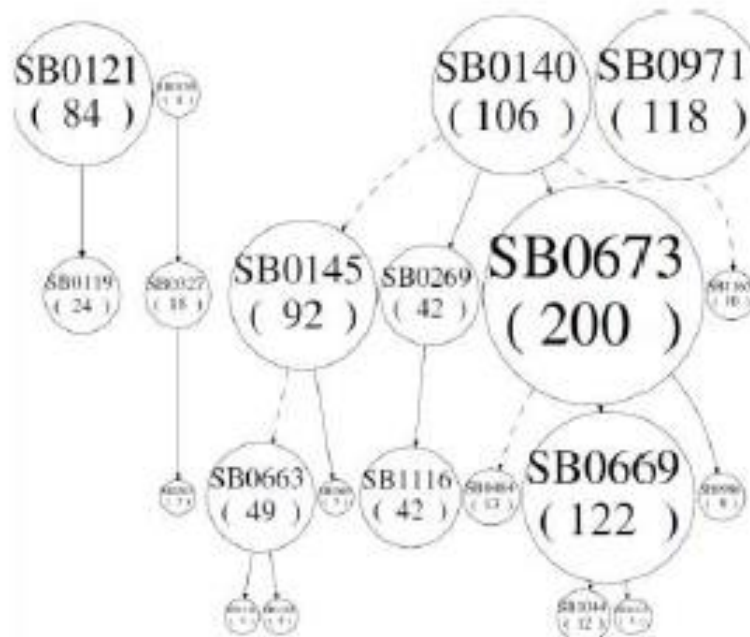


Figure 3. Spoligoforest of *M. bovis* spoligotypes obtained from States other than Jalisco in Mexico. Nodes are labeled with the SB identifier as indicated in *mbovis.org*; numbers in parenthesis indicate cluster size. Lines between nodes reflect hypothetical evolutionary relationships among spoligotypes with arrows denoting descent. Continuous lines indicate stronger relationship.

Source: <http://spoltools.emi.unsw.edu.au/>

weakness of this study. This suggests that more knowledge on epidemiological methodologies, especially databases maintenance by bodies responsible for animal health care in Mexico, is required.

Conclusions

The most frequent spoligotypes of *M. bovis* found in Jalisco are also the most frequent ones in other parts of Mexico. However, there is no evidence to conclude that Jalisco is the source of infection since no information on movement and destination of animals could be documented. It is believed that similarity of spoligotypes around the country is in fact due to the indiscriminate movement of animals. The long history of bTB in Mexican herds, which favors the increase and dissemination of new and existing *M. bovis* strains in the population could be another reason.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

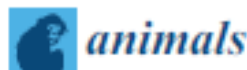
ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the slaughter houses owners in the State of Jalisco, and MVZ Erick Fernando Rodriguez Duran for his support in samples collection.

REFERENCES

- Acosta-Salinas R, Estrada-Chávez C, Millán-Suazo F (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. *Revista Técnica Pecuaria en México* 47(4):380-412.
- Barandiarán S, Vivot MM, Moras EV, Melke V, Catalá A, Zumárraga MJ (2011). *Mycobacterium bovis* in seah: Spoligotyping of isolates from Argentina. *Vet. Med. Int.* 2011:979647.
- Bestnek F, Taylor NM (2014). Assessment of bovine tuberculosis and its risk factors in cattle and humans, at and around Dilla Town, Southern Ethiopia. *Anim. Vet. Sci.* 2(4):94-100.
- Blechak JD, Tailleux L, Mitran A, Barreiro LB, Glad Y (2015). Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response. *Sci. Rep.* 5:18882.
- Bobadilla-del Valle M, Torres-González P, Cervero-Hernández ME, Martínez-Gombos A, Crabtree-Ramírez B, Chávez-Mazar B (2015). Trends of *Mycobacterium bovis* isolation and first-line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: A fifteen-year laboratory-based surveillance. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9(9):e0004124.
- Boddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Botzger EC (1990). Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of rRNA.

8.4. Artículo 3. Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis.



Article

Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis

Sara González-Ruiz ¹, Maria G. Strillacci ^{2*}, Marina Durán-Aguilar ³, Germinal J. Cantó-Alarcón ³, Sara E. Herrera-Rodríguez ⁴, Alessandro Bagnato ², Luis E. Guzmán ⁴, Feliciano Milán-Suazo ³ and Sergio I. Román-Ponce ^{4,*}

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro C.P. 76230, Mexico

² Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano, Via Trentacoste, 2, 20134 Milano, Italy

³ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro C.P. 76230, Mexico

⁴ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Guadalajara C.P. 44700, Mexico

⁵ Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP, Tepetitlán de Morelos 47600, Mexico

⁶ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento animal, INIFAP, SAGARPA, Km. 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Colón, Querétaro C.P. 76280, Mexico

* Correspondence: maria.strillacci@unimi.it (M.G.S.); roman.sergio@inifap.gob.mx (S.I.R.-P); Tel: +39-02-50319754 (M.G.S.); +52-(800)-0862-222 (ext. 80208) (S.I.R.-P)

Received: 20 May 2019; Accepted: 24 August 2019; Published: 30 August 2019



Simple Summary: Bovine tuberculosis is an infectious disease of cattle caused by *Mycobacterium bovis* characterized by the formation of tubercles in any organ or tissue. Bovine tuberculosis represents a significant veterinary and public health problem in many parts of the world. It is zoonotic, transmitted to humans through consumption of infected milk and other cattle products. Although many factors influence infection and progression of the disease, there must be an important host genetic component that explains why some animals get sick and others remain healthy. We present evidence of genetic variants associated with resistance to tuberculosis in Mexican Holstein dairy cattle using a case-control approach with a selective DNA pooling. Here, we identified novel quantitative trait loci harboring genes involved in *Mycobacterium* spp. immune response. This is a first screening about resistance to tuberculosis infection on Mexican Holstein cattle based on a dense single nucleotide polymorphism chip. The identified genes belong to both, the already known, and the undisclosed quantitative trait loci regions.

Abstract: Bovine tuberculosis (BTB) is a disease of cattle that represents a risk to public health and causes severe economic losses to the livestock industry. Recently, genetic studies, like genome-wide association studies (GWAS) have greatly improved the investigation of complex diseases identifying thousands of disease-associated genomic variants. Here, we present evidence of genetic variants associated with resistance to TB in Mexican dairy cattle using a case-control approach with a selective DNA pooling experimental design. A total of 154 QTLs (quantitative trait loci regions) at 10% FDR (proportion of false positives), 42 at 5% FDR and 5 at 1% FDR have been identified, which harbored 172 annotated genes. On BTA13, five new QTLs were identified in the *MACROD2* and *KIF16B* genes, supporting their involvement in resistance to BTB. Six QTLs harbor seven annotated genes that have been previously reported as involved in immune response against *Mycobacterium* spp.: BTA (Bos taurus autosome) 1 (*CD80*), BTA3 (*CTSS*), BTA 3 (*FCGR1A*), BTA 23 (*HFE*), BTA 25 (*IL21R*), and BTA 29 (*ANOS* and *SIGIRR*). We identified novel QTLs harboring genes involved in *Mycobacterium* spp.

immune response. This is a first screening for resistance to TB infection on Mexican dairy cattle based on a dense SNP (Single Nucleotide Polymorphism) chip.

Keywords: bovine tuberculosis resistance; DNA pooling; SNP; QTL; genome-wide association study

1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by *Mycobacterium bovis* is a chronic infectious disease characterized by granulomas in affected tissues [1,2]. *M. bovis* infects a wide range of mammalian hosts, domestic and wildlife species, and humans; therefore, it is a risk to public health [3]. It has been estimated that nearly 10 million people are affected by tuberculosis worldwide every year, and that the proportion of cases due to *M. bovis* in humans during the last two decades was from 0.5% to 13%, depending on the study population [4–6]. Additionally, bTB causes economic losses to the livestock industry: infected animals have poor production performance, die or are disposed of prematurely [7,8]. Cattle TB is considered the fourth most significant livestock disease in terms of impact on human health in developing countries, including risks to species other than cattle and the wildlife species [9]. The disease persists in livestock in spite of the on-going eradication program that has been established. The program relies on a test-and-slaughter strategy in herds of cattle, and carcass inspection at abattoirs [10].

Recently, genetic studies like genome-wide association studies (GWASs) have greatly improved the understanding of complex diseases identifying thousands of disease-associated genomic variants [11]. Evidence suggests that genetic variation and resistance to bTB exists in many species, including humans, mice, deer and cattle [12,13]. Heritability values estimated on UK and Irish cattle populations have shown that individual variability for host resistance to TB has a genetic basis [14,15]. Other studies have also shown genetic variation for resistance of cattle to TB [15]; higher resistance has been reported in *Bos taurus indicus* compared to *Bos taurus* [16,17].

In Mexico, bTB is still an endemic disease, and the availability of genomic tools, such as high-density SNP (Single Nucleotide Polymorphism), allow disclosing QTL (quantitative trait loci) regions harboring genes involved in the immune response against TB, as previously reported in different cattle populations. Several studies have in fact identified genetic loci associated with bTB resistance. They included polymorphisms in candidate genes like *SLC11A1* in African Zebu cattle [18], *TLRI* in Chinese Holsteins [19], SNP on BTA23 in Irish dairy herds [20], and three other genetic loci on BTA2 and 13 were also associated [21]. A GWAS involving Irish Holsteins identified a genomic region in BTA 22 containing the taurine transporter gene *SLC5A6*, which was suggestively associated with resistance [22]. In a case-control study, GWAS used in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) identified chromosomal regions (BTA9, BTA11 and BTA12) associated with this disease; and provides evidence of genetic loci involvement in humoral response to MAP [23].

Therefore, the aim of this study was to identify QTL regions involved in resistance to TB in Mexican dairy cattle using a GWAS case-control approach with a selective DNA pooling experimental design.

2. Materials and Methods

This project was approved by the Bioethics Committee of the Natural Sciences Department of the Autonomous University of Queretaro under registry number 29FCN2016.

2.1. Tissue Samples

Tissue samples were collected from carcasses at slaughterhouses in the States of Jalisco and Aguascalientes. These two states are located in central Mexico where the within-herd prevalence of tuberculosis in dairy cattle is about 16% [24,25]. Animals slaughtered were Holstein cows from small family-run herds with an average size of 70 head.

immune response. This is a first screening for resistance to TB infection on Mexican dairy cattle based on a dense SNP (Single Nucleotide Polymorphism) chip.

Keywords: bovine tuberculosis resistance; DNA pooling; SNP; QTL; genome-wide association study

1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by *Mycobacterium bovis* is a chronic infectious disease characterized by granulomas in affected tissues [1,2]. *M. bovis* infects a wide range of mammalian hosts, domestic and wildlife species, and humans; therefore, it is a risk to public health [3]. It has been estimated that nearly 10 million people are affected by tuberculosis worldwide every year, and that the proportion of cases due to *M. bovis* in humans during the last two decades was from 0.5% to 13%, depending on the study population [4–6]. Additionally, bTB causes economic losses to the livestock industry: infected animals have poor production performance, die or are disposed of prematurely [7,8]. Cattle TB is considered the fourth most significant livestock disease in terms of impact on human health in developing countries, including risks to species other than cattle and the wildlife species [9]. The disease persists in livestock in spite of the on-going eradication program that has been established. The program relies on a test-and-slaughter strategy in herds of cattle, and carcass inspection at abattoirs [10].

Recently, genetic studies like genome-wide association studies (GWASs) have greatly improved the understanding of complex diseases identifying thousands of disease-associated genomic variants [11]. Evidence suggests that genetic variation and resistance to bTB exists in many species, including humans, mice, deer and cattle [12,13]. Heritability values estimated on UK and Irish cattle populations have shown that individual variability for host resistance to TB has a genetic basis [14,15]. Other studies have also shown genetic variation for resistance of cattle to TB [15]; higher resistance has been reported in *Bos taurus indicus* compared to *Bos taurus* [16,17].

In Mexico, bTB is still an endemic disease, and the availability of genomic tools, such as high-density SNP (Single Nucleotide Polymorphism), allow disclosing QTL (quantitative trait loci) regions harboring genes involved in the immune response against TB, as previously reported in different cattle populations. Several studies have in fact identified genetic loci associated with bTB resistance. They included polymorphisms in candidate genes like *SLC11A1* in African Zebu cattle [18], *TLR3* in Chinese Holsteins [19], SNP on *BTA23* in Irish dairy herds [20], and three other genetic loci on *BTA2* and *13* were also associated [21]. A GWAS involving Irish Holsteins identified a genomic region in *BTA22* containing the taurine transporter gene *SLC6A6*, which was suggestively associated with resistance [22]. In a case-control study, GWAS used in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) identified chromosomal regions (*BTA9*, *BTA11* and *BTA12*) associated with this disease; and provides evidence of genetic loci involvement in humoral response to MAP [23].

Therefore, the aim of this study was to identify QTL regions involved in resistance to TB in Mexican dairy cattle using a GWAS case-control approach with a selective DNA pooling experimental design.

2. Materials and Methods

This project was approved by the Bioethics Committee of the Natural Sciences Department of the Autonomous University of Querétaro under registry number 29PCN2016.

2.1. Tissue Samples

Tissue samples were collected from carcasses at slaughterhouses in the States of Jalisco and Aguascalientes. These two states are located in central Mexico where the within-herd prevalence of tuberculosis in dairy cattle is about 16% [24,25]. Animals slaughtered were Holstein cows from small family-run herds with an average size of 70 head.

DNA extraction was performed using a commercial kit (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer recommendations. Quantity and quality control on each DNA sample was performed by spectrophotometry with NanoDrop[™] 2000 equipment (Thermo Fisher Scientific). Integrity of the DNA was determined by electrophoresis on a 1% agarose gel pre-stained with GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA).

All DNA samples were normalized at a concentration of 50 ng/μL. DNA pools were then built by taking equivalent amounts of volume from each DNA sample, thus the final concentration for each pool was 50 ng/μL according to Illumina array requirements.

A total of 75 DNA samples were used in building each pool, and biological, technical and array replicates were designed as suggested [33,34]. Pools for cases were composed of two independent groups of 75 animals (average age of 47 ± 1.8 months and the proportion was 75% females and 25% males) positive for visible lesions at carcass inspection and positive for *M. bovis* isolation by culture (Figure 1). These two pools represent two independent biological replicates. The pools for controls were composed of three independent groups of 75 animals (average age of 43 ± 2.8 months and the proportion was 62% females and 38% males) with no visible lesions and negative for *M. bovis* isolation by culture. Each of the pools was produced in two replicates to account for possible errors in pooling the individuals (technical pooling replicates, i.e., Pool_Rep “_A” and “_B” in Table 1) and respectively genotyped three times to account for array technical error (technical array replicates, i.e., Array_Rep “_1”, “_2”, and “_3” in Table 1).

Table 1. Scheme of case (CA) and controls (CT) pool definitions, and of genotyping.

CASES			CONTROLS		
Biological	Technical		Biological	Technical	
Bio_rep ^a	Pool_Rep ^b	Array_Rep ^c	Bio_rep ^a	Pool_Rep ^b	Array_Rep ^c
CA_1	CA1_A	CA_1A_1	CT_1	CT1_A	CT_1A_1
		CA_1A_2			CT_1A_2
		CA_1A_3			CT_1A_3
	CA1_B	CA_1B_1		CT_1B_1	
		CA_1B_2		CT_1B_2	
		CA_1B_3		CT_1B_3	
CA_2	CA2_A	CA_2A_1	CT_2	CT2_A	CT_2A_1
		CA_2A_2			CT_2A_2
		CA_2A_3			CT_2A_3
	CA2_B	CA_2B_1		CT_2B_1	
		CA_2B_2		CT_2B_2	
		CA_2B_3		CT_2B_3	
CT_3	CT3_A	CT_3A_1	CT_3	CT3_A	CT_3A_3
		CT_3A_3			CT_3B_1
		CT_3B_1			CT_3B_3
	CT3_B	CT_3B_3		CT_3B_3	
		CT_3B_3		CT_3B_3	
		CT_3B_3		CT_3B_3	

^a Bio_rep = biological replicate; ^b Pool_Rep = technical pooling replicate; ^c Array_Rep = technical array replicate.

The 10 pools (biological and technical replicates) were processed in three array replicates each, on the Illumina BovineHD BeadChips (777,962 SNP), following the Infinium protocol obtaining a total

of 30 sets of B-allele frequency for each SNP. SNPs position was determined according to the UMD 3.1 bovine assembly.

2.4. Statistical Analysis of Pool

The B-allele frequencies (BAF) values for each SNP were obtained from the self-normalization algorithm of Illumina BeadStudio software[®] for each of the three arrays technical replicates of the 10 pools. The BAF is a very accurate measure of the frequency of the alleles in all individuals together in a pool as previously reported [29].

First, a quality control was performed at array technical replicate comparing the standard deviation (SD) distribution of B-allele frequencies among each triplet of array technical replicates. Two array-replicates, one case and one control, were eliminated from the analysis because the value of their B-allele frequency diverged from the other two technical array-replicates. Second, a quality control on the BAF estimation was performed at SNP level as follows: the SD among BAF from the replicate assays (biological, pool and array technical replicates) within cases and controls was calculated, and the markers showing the largest 10% SD were excluded from the analysis. Finally, only SNPs with minor allele frequency (MAF) ≥ 0.05 were retained. After editing, a total of 438,555 SNPs (of which 10,034 were on BTX (*Bos taurus* X autosome) were used in the association analysis.

GWAS was performed comparing at each marker the allele frequencies obtained for the cases pools with those obtained in the control pools for each marker (averaged over replicates within case and within control) according to the selective DNA pooling (SDP) design and methods as described in detail [31,32]. GWAS was performed after excluding monomorphic SNPs, SNPs mapped on BTY, mitochondrial SNPs, and SNPs without chromosome position.

A single-marker test for marker-trait association was used, and the *p*-value for each marker calculated as

$$Z_{\text{test}} = D_{\text{test}} / \text{SD} (D_{\text{null}}) \quad (1)$$

where: D_{test} is the difference of the B-allele frequencies means among tails, and D_{null} is the difference of the B-allele frequencies means within tails.

2.5. Quantitative Trait Loci Region Definition

The nominal *P* values at different PFP (proportion of false positives) thresholds, i.e., 1%, 5% and 10%, have been identified according to Fernando et al. [34,35], and the corresponding $-\log_{10}$ (*p*-value) calculated, resulting: (i) for PFP at 1%, 4.58; (ii) for PFP at 5%, 3.17; (iii) for PFP at 10%, 2.53. As in Lipkin et al. [31], moving averages of $-\log_{10}$ (*p*-values) were calculated considering a window of 16 SNP markers, corresponding to an average-window-size of about 100 Kb. As shown in Lipkin et al. [31], PFP is the appropriate approach to correct for multiple testing when the moving averages approach proposed by the same authors is used to identify QTL regions. As such the window average values above the PFP thresholds of 1%, 5% and 10% have been considered as leading QTL average. A 1 log drop in flanking average values defined the boundaries of the QTL region (QTLR). The leading SNP is the one showing the largest $-\log_{10}$ (*p*-value) among those in each QTLR.

2.6. Functional Annotation of the QTLR

The SNPchiMp online database [36] was utilized to match the Illumina SNP name with the SNP rsID (Reference SNP cluster ID). The European Variation Archive (EVA) variant browser of EMBL-EBI [37] allowed annotating all the leading SNPs through the rsID. The full genes set (*Bos taurus*: Ensembl Gene 92) was used [38]. Gene ontology (GO) functional annotation and KEGG pathway analyses using the Gene ontology (GO) and pathway analyses were performed using the DAVID Bioinformatics Resources software, version 6.8 [39]. In addition, bovine QTL available from Animal Genome Database [40] were catalogued into our QTLRs by overlapping.

STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) was used to investigate the existence of gene networks in cattle among ones in QTLs identified with PFP at 10%. Those found in the gene network were annotated by STRING using both bovine and human databases.

3. Results

From the 375 animals included in the study, 34% were males, and 65% females, ages 12 to 108 months; 44 months was the most frequent age (22%). From the cases group, lesions were found mainly in lymph nodes of head (retropharyngeal 51%) and thorax (mediastinal and tracheobronchial, 61%), some animals had lesions in more than one lymph node.

QTLs Associated with Resistance/Susceptibility to BTB

A total 154 QTLs at 10% PFP were identified (Figure 2, Table S1). In general, all these regions were distributed homogeneously over all autosomes (with the exception that none were found on BTA15 and BTA17), and on chromosome X (n. 2), defined by 3296 SNPs. The average length of the QTLs was 93,446 bp. Table S1 also includes information about the position of the leading SNP for each QTL on the chromosome, the number of SNPs defining the regions, and its location in the genes annotated within the QTL, and the number of SNPs pertaining to the regions above each of the three PFP thresholds.

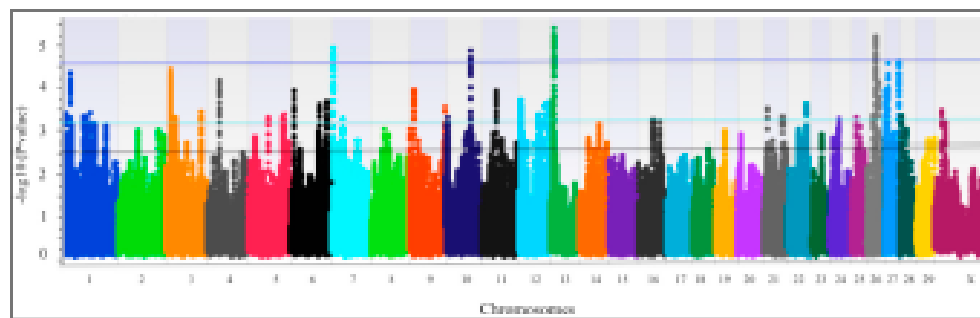


Figure 2. Manhattan plots of QTL (Quantitative Trait Loci Regions) for all chromosomes. Horizontal lines represent the 1% PFP (proportion of false positives) (blue), the 5% PFP (light blue), and the 10% PFP (black) thresholds.

One hundred and seventy-two genes (including 2 miRNA and 5 tRNA) were catalogued in the QTLs using the *Bos taurus* Ensembl Gene annotation release 92 (Table S2). The DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Database recognized all these genes (excluding miRNA and tRNA), but not for all of them provided the annotated information according to the GO (Gene Ontology) and the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways terms as in Table 2 (reporting only gene function classifications resulted with a nominal p value ≤ 0.05). As shown in Table 2, most genes refer to the immune response and structural terms. Table S2 reports: (i) the list of genes annotated in the QTLs (list of genes); (ii) the gene annotation according to the DAVID database classification reported as clustered and not clustered genes including those with a nominal p value ≥ 0.05 .

Table 2. Results of the gene annotation: DAVID GO and pathway analysis (KEGG).

Term	Count	p-Value	Genes
Biological process			
GO:0006334: nucleosome assembly	6	9.42×10^5	<i>HIST1H2BB, HIST1H1C, HIST1H1A, H2B, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0006335: DNA replication-dependent nucleosome assembly	3	6.12×10^3	<i>H4, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0051290: protein heterotrimerization	3	6.81×10^3	<i>H4, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0098792: xenophagy	5	2.27×10^3	<i>TMEM39A, SNRPB2, CPA3, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0002230: positive regulation of defense response to virus by host	5	3.68×10^3	<i>TMEM39A, SNRPB2, CPA3, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0046627: negative regulation of insulin receptor signaling pathway	3	9.09×10^3	<i>PRKCD, KANK1, PRKCB</i>
GO:0042742: defense response to bacterium	4	1.63×10^2	<i>STAB1, FCGR1A, PRKCD, TM7T</i>
Cellular Components			
GO:0000786: nucleosome	7	1.60×10^5	<i>H4, HIST1H1C, HIST1H1A, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0000788: nuclear nucleosome	5	2.47×10^6	<i>HIST1H2BB, H2B, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0000784: nuclear chromosome, telomeric region	4	2.3×10^2	<i>H4, TNKS, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
GO:0001716: integral component of endoplasmic reticulum membrane	4	1.50×10^2	<i>PIGG, SARAF, MBOAT4, SLC27A2</i>
GO:0005615: extracellular space	13	3.32×10^2	<i>A2M, H2B, HBE, FSTL1, CTSS, OVOS2, ESF1, VEGFC, GPI, CTSK, CPA3, CPB1, SMARCA4</i>
GO:0005788: endoplasmic reticulum lumen	3	4.77×10^2	<i>EOGT, SLC27A2, POGD, LIT1</i>
Molecular Functions			
GO:0046982: protein heterodimerization activity	5	7.15×10^3	<i>AGTR1, HIST1H2BB, H4, H2B, FOXPI</i>
GO:0042903: histone binding	3	3.67×10^2	<i>H4, PRKCB, SMARCA4</i>
KEGG Pathways			
hta05322: Systemic lupus erythematosus	9	7.64×10^6	<i>HIST1H2BB, H4, CD80, FCGR1A, HIST1H2BF, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
hta05034: Alcoholism	8	4.32×10^6	<i>HIST1H2BB, HRAS, H4, HIST1H2BF, H2B, HIST1H2AK, HIST1H3G, HIST1H3I</i>
hta05203: Viral carcinogenesis	5	1.92×10^3	<i>HIST1H2BB, HRAS, H4, HIST1H2BF, H2B</i>
hta05114: Other types of O-glycan biosynthesis	3	2.18×10^2	<i>ST6GAL2, EOGT, POGD, LIT1</i>

In Figure 3, the gene network obtained for genes annotated with STRING is shown for *Bos taurus* and *Homo sapiens* proteins. The genes shown are only the ones in QTLs that were part of a network. Table S3 reports the GO and pathway analysis for the genes included in the networks of Figure 3.

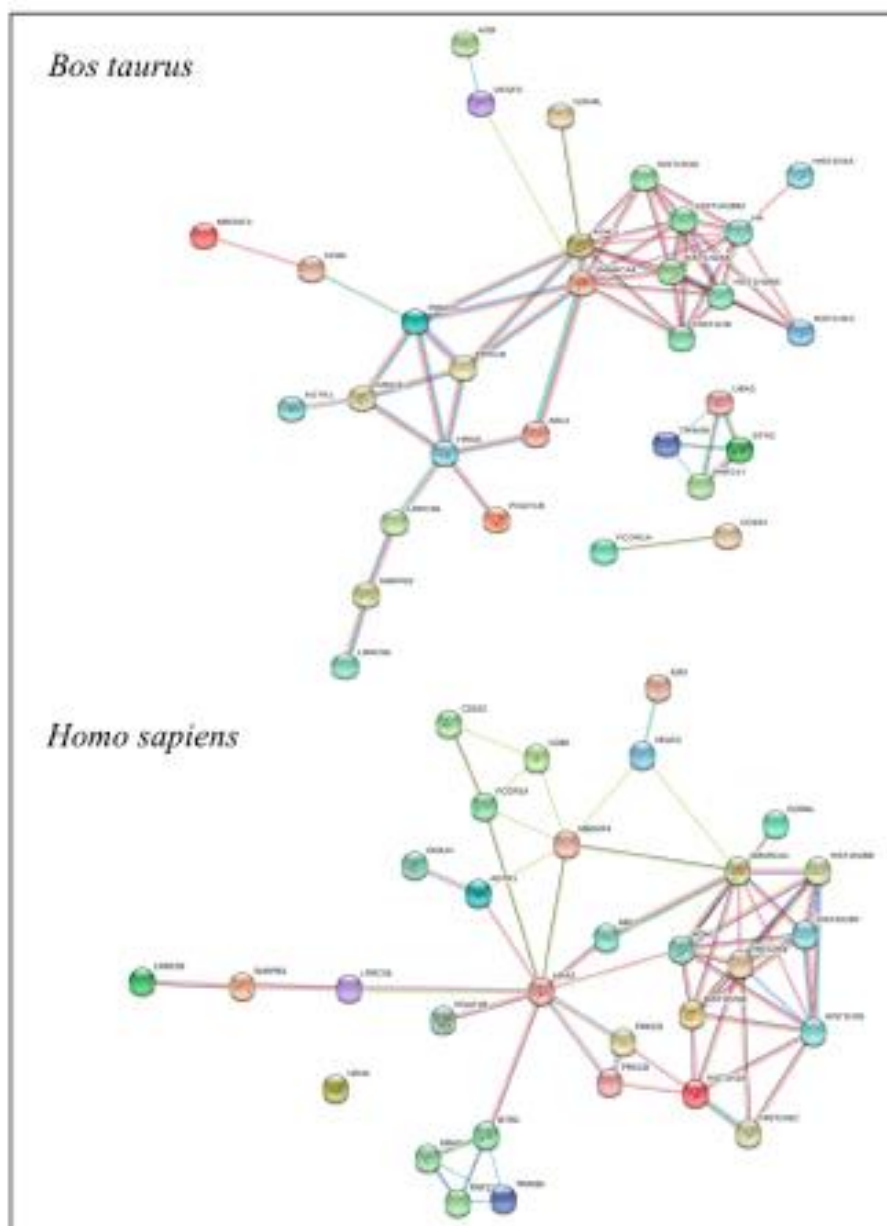


Figure 3. Gene networks in cattle among the ones in QTLs identified with FDR at 10% (Bovine and Human databases).

4. Discussion

Bovine TB is one of the most prevalent and important diseases in the livestock industry, as well as in wildlife and human population [3]; its eradication is still a priority for many countries. Current strategies to reduce the prevalence in the herds of livestock focus primarily on test-and-disposal of reactors, and abattoir surveillance. In developing countries, however, the success of these programs has been partial because of the poor sensitivity of the tuberculin test and the difficulties tracing back infected

animals identified at slaughterhouses. New strategies have been recommended, such as vaccination, in either cattle or the wildlife species [41], estimation of direct genomic estimated breeding values (EBVs) in UK dairy cattle [42], or to increase host resistance through breeding practices [43]. Recent studies in fact have disclosed genetic variability affecting resistance to bTB [20,41,43–48] suggesting the possibility of implementing genomic selection for that feature in cattle.

The genes present in the novel QTLs according to the PFP, 1%, 5% and 10% *p* values threshold were:

4.1. QTLR_1%_PFP

Five QTLs distributed on different BTA (7, 10, 13, 30 and 31) were identified, but the three genes mapping within these regions are not involved in metabolic pathways associated with bTB.

4.2. QTLR_5%_PFP

4.2.1. BTA 1

The QTLR_10 and QTLR_16 include genes involved in immune response to disease. In detail, the first region harbors the *TIGIT* gene (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) domain), an inhibitor of the T cell proliferation, the cytokine production in CD4+ T cells, and of the NK cells cytolytic activity [49]. As reported by Joller et al. [50], the altered balance between activation and inhibitory immune signals can result in increased susceptibility to infection or to induction of autoimmunity.

The *NAALADL2* gene (N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2), whose function is not well known, is located within the QTLR_16. This gene promotes a pro-migratory and pro-metastatic phenotype in cancer [51], and was recently associated with bovine respiratory disease susceptibility [31].

4.2.2. BTA 3

The *TRIM33* gene (tripartite motif containing 33), located in QTLR_27 on BTA 3, is involved in migration of macrophages and neutrophils towards inflammatory stimulus in vertebrate tissues [52]. Weng et al. [53] reported *TRIM33* roles in transcriptional regulation during hematopoiesis, tumor suppressor activity in multiple tissues, erythropoiesis, and DNA repair.

4.2.3. BTA 5

On this chromosome, the QTLR_37 harbors the *CD163* gene (CD163 molecule). This gene, expressed on monocytes, macrophages and subpopulations of hematopoietic progenitor is involved in the clearance of haptoglobin-hemoglobin complexes by mediating endocytosis, and prevents the toxic and oxidative effects of free hemoglobin. Different mediators regulate the *CD163* gene expression: up-regulation by glucocorticoids and IL10, and down-regulation by lipopolysaccharide, gamma-interferon, and tumor necrosis factor alpha [54].

4.2.4. BTA 13

Interestingly, from 8.1 Mb to 10.2 Mb, five QTLs (QTLR_95, QTLR_96, QTLR_97, QTLR_98 and QTLR_99) are found: the first four located within the gene *MACROD2* (MACRO domain containing 2), and the fifth one is in between the end of the gene *MACROD2* and a second gene *KIF16B* (Kinesin Family Member 16 B) (Figure 4). The individual $-\log_{10} p$ values show very clear peaks supporting the indication that in this 2 Mb region the *MACROD2* gene and the *KIF16B* gene may play a role in resistance to TB. According to Figure 4 showing the introns and exons of *MACROD2* gene (NCBI RefSeq gene 105) and the GWAS results for this chromosomal region, the QTLR_98 includes three exons (blue vertical lines). Nevertheless, the *MACROD2* gene is very long and its annotation still needs additional validation [55].

The *KIF16B* gene encodes a kinesin-like protein that could be involved in intracellular trafficking [56].

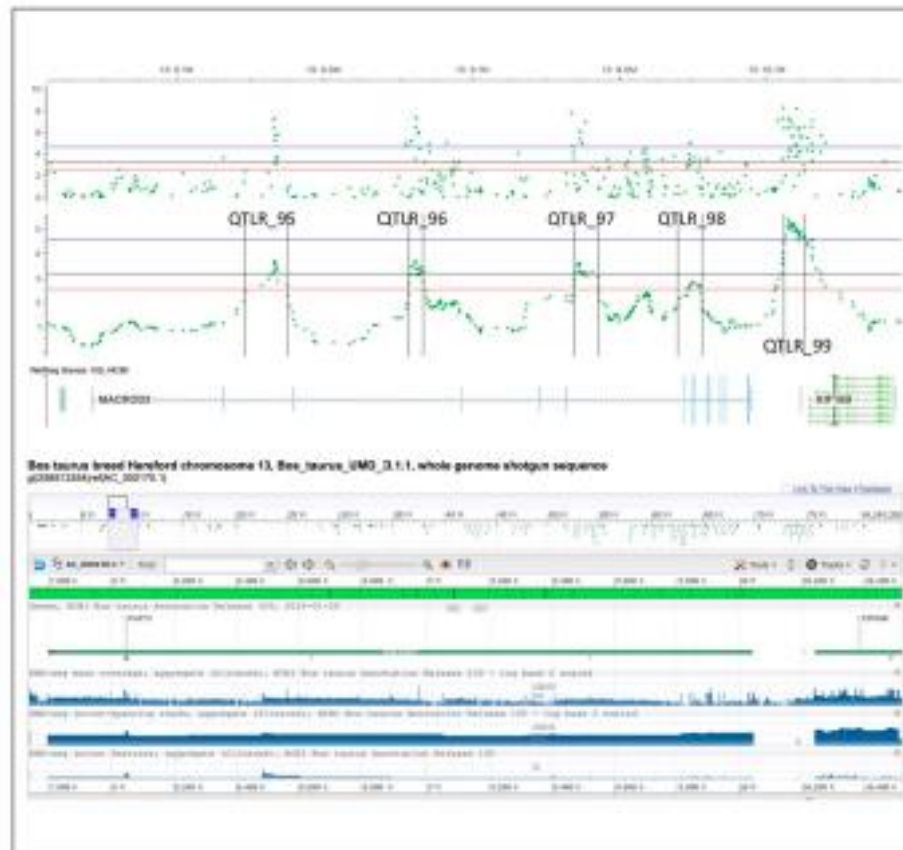


Figure 4. The location of *MACROD2* gene is spread over the QTLs 95–98 (NCBI refseq gene 105).

4.3. *QTLR_10%_PFP*

BTA 2

The *DNER* gene (delta/notch-like EGF repeat containing) within the *QTLR_21* on BTA 2, is among those differentially expressed for inflammatory diseases, connective tissue disorders and immunological diseases in cattle [57]. In addition, the *DNER* gene expression level has been shown to decrease in highly marbled beef cattle [98].

Six QTLs harbor seven genes that have been already associated with susceptibility/resistance to TB: *QTLR_12* on BTA 1 (*CD80*), *QTLR_25* on BTA3 (*CTSS*), *QTLR_26* on BTA 3 (*FCGR1A*), *QTLR_127* on BTA 23 (*HFE*), *QTLR_133* on BTA 25 (*IL21R*), and *QTLR_152* on BTA 29 (*ANO9* and *SIGIRR*). These genes are all involved in immune response against *Mycobacterium* spp.

- Cathepsins, including Cathepsin S (*CTSS*) are proteolytic enzymes that function mainly in lysosomes, where they contribute to pathogen killing by their involvement in antigen presentation pathways. Pires et al. [59] demonstrated the role of this class of proteins in the control of *M. tuberculosis* by manipulating the cathepsin expression by pathogenic mycobacteria to favor its intracellular survival.

- The protein encoded by the *CD80* gene (CD80 molecule), the B-lymphocyte activation antigen B7-1 is a membrane receptor that affects the immunological reactivity of T-lymphocytes when its expression decreases. In addition, *CD80* has a role in enhancing the anti-tuberculosis immunity [60].
- The *FCGR1A* gene (Fc fragment of IgG receptor 1a) expression, together with that of the *BLRI* gene has been considered as potential marker for monitoring the extent of TB disease and to predict treatment outcome in children affected by *M. tuberculosis* [61].
- Booty et al. [62] reported that the cytokine IL-21, produced predominantly by activated CD4+ T cells and CD8+ T cells, is an essential signaling marker for host resistance to *M. tuberculosis* infection via the IL-21 receptor (IL-21R).
- Gomes-Pereira et al. [63] reported an increased susceptibility to *M. avium* in Hemochromatosis Protein HFE-Deficient Mice. *HFE* (homeostatic iron regulator) is a fundamental protein involved in the regulation of cellular iron uptake and iron homeostasis. Studies indicate that monocytes with mutated *HFE* have decreased intracellular iron levels [64]. Also, Wang et al. [65] demonstrated that hemochromatosis impacts the regulation of macrophage cytokine translation and, consequently the inflammatory response.
- The *ANO9* gene, also known as *TMEM16f* (anoctamin 9), together with the *SIGIRR* and the *PKP3* genes constitute a polymorphic complex associated with susceptibility to tuberculosis [66]. The *SIGIRR* gene, also known as Toll IL-1 receptor 8, is a regulatory protein acting to inhibit ILRs and TLRs signaling [67]. The *PKP3*, the third part of this complex gene, maps 6.2 Kb from the end of the QTLR_152.

In addition, three QTLRs identified in our study (QTLR_43 on BTA6, QTLR_115, and QTLR_118 on BTA 21) overlap with those found by Richardson et al. [20] in a study on bovine tuberculosis susceptibility performed in a population of Holstein-Friesian bulls (ID: 96694; 96508, 96511, 96525, 96514, 96517, 96411, 96549, and 96497). Also, the QTLR_84 on BTA12 and QTLR_139 on BTA26 are included within the "Bovine respiratory disease susceptibility QTL (ID: 98663)" and the "Heat tolerance QTL (ID: 31198)", respectively.

5. Conclusions

The results presented here reveal novel QTLRs and confirm mapped loci for resistance to tuberculosis in dairy cattle. The novel QTLRs located on BTA 1, 3, 5, 25 and 29 harbor genes related to immune response. Our results confirm QTL regions previously mapped on BTA 2, 6, 13, 21, 22 and 23 related to resistance to bTB in other dairy cattle populations.

Genomic regions and genes identified in the present study with a case-control selective DNA pooling approach were significantly associated with resistance to TB in cattle. The findings of this study could be used to improve the knowledge on the bTB immune response against *Mycobacterium bovis*, and thus provide the basis for genetic control of this disease in cattle.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2615/9/9/636/s1>, Table S1: QTLRs identified on BTAs and on BTX, and the complete list of all genes mapped within QTLRs. Highlighted regions in bold are those found above 5% FFP and 1% FFP thresholds. Table S2: Reports the list of genes annotated in the QTLRs. Table S3: Reports the GO and pathway analysis for the gene included in the networks of Figure 3.

Author Contributions: Conceptualization, EM-S. and S.L.R.-P.; Data curation, M.D.-A., G.J.C.-A., S.E.H.-R. and L.E.G.; Formal analysis, S.G.-R., M.G.S. and A.B.; Funding acquisition, FM-S. and S.L.R.-P.; Investigation, M.G.S.; Methodology, G.J.C.-A. and L.E.G., M.D.-A. and G.J.C.-A.; Supervision, M.G.S., M.D.-A., S.E.H.-R., FM-S. and S.L.R.-P.; Writing—original draft, S.G.-R., M.G.S.; Writing—review & editing, A.B., EM-S., S.L.R.-P.

Funding: This research was funded by the National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock Research, and the Special Funds for Research (FOPER) from the Autonomous University of Queretaro.

Acknowledgments: We acknowledge the support from the slaughterhouses of the State of Jalisco for allowing sampling collection, Dulce Anahy Verdugo Escárrega and Susana Sosa Gallegos for their support in sample collection and laboratory analysis, and Erica Gorla for her support in data processing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Phillips, C.J.C.; Foster, C.R.W.; Morris, P.A.; Yverson, R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* **2003**, *74*, 1–15. [[CrossRef](#)]
2. Abalos, P.; Retamal, P. Tuberculosis: Una zoonosis re-emergente? *Rev. Sci.* **2004**, *23*, 583–594. [[CrossRef](#)]
3. Blischak, J.D.; Tailleux, L.; Mitrano, A.; Barreiro, L.B.; Gilad, Y. Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Müller, B.; Hity, M.; Berg, S.; Garcia-Pelayo, M.C.; Dale, J.; Boschini, M.L.; Cadmus, S.; Ngandolo, B.N.; Godreuil, S.; Diguimbaye-Djaibé, C.; et al. African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 1951–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Olsa-Popelka, E.; Muwonge, A.; Peters, A.; Dean, A.S.; Mumford, E.; Erlacher-Vindel, E.; Forcella, S.; Silk, B.J.; Ditiu, L.; El Idrissi, A. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*: a call for action. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 21–25. [[CrossRef](#)]
6. Perea-Razo, C.A.; Milián-Suazo, E.; Bircenas-Reyes, I.; Sosa-Gallegos, S.; Rodríguez-Hernández, E.; Flores-Villalba, S.; Canto-Alarcón, G.J. Whole genome sequencing for detection of zoonotic tuberculosis in Querétaro, Mexico. *J. Infect. Dis. Prev. Med.* **2017**, *5*, 2. [[CrossRef](#)]
7. Milián-Suazo, E.; Pérez-Guarero, L.; Arriaga-Díaz, C.; Romero-Yones, C.; Escartin-Chávez, M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Publ. Mex.* **2008**, *50*, 1–6.
8. Elias, K.; Hussein, D.; Asseged, B.; Wondwossen, Y.; Gebeyehu, M. Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms. *Res. Sci. Tech.* **2008**, *27*, 915–923. [[CrossRef](#)]
9. Pery, B.D.; Randolph, Y.E.; McDermott, J.J.; Sones, K.R.; Thornton, P.K. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty; ILRI (International Livestock Research Institute): Nairobi, Kenya, 2002.
10. De la Rúa-Domenech, R.; Goodchild, A.Y.; Vordermeier, M.; Howinson, R.G.; Christiansen, K.H.; Clifton-Hadley, R.S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, C-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* **2006**, *81*, 190–210. [[CrossRef](#)]
11. Uzun, C.; Henn, B.M.; Franke, A.; Wittig, M.; van Helden, P.D.; Hoal, E.G.; Müller, M. A post-GWAS analysis of predicted regulatory s and tuberculosis susceptibility. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)]
12. Allen, A.R.; Minuzzi, G.; Glass, E.J.; Skuce, R.A.; McDowell, S.W.J.; Woolliams, J.A.; Bishop, S.C. Bovine tuberculosis: The genetic basis of host susceptibility. *Proc. Biol. Sci.* **2010**, *277*, 2737–2745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hernández-Marín, J.A.; Cortez-Romero, C.; Clemente-Sánchez, E.; Gallegos-Sánchez, J.; Salazar-Ortiz, J.; Yurango-Arámula, L.A. Risk of transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) in domestic and wild species. *AGRO Prod.* **2014**, *7*, 65–70.
14. Birmingham, M.L.; More, S.J.; Good, M.; Cromie, A.R.; Higgins, L.M.; Berry, D.P. Genetic correlations between measures of *Mycobacterium bovis* infection and economically important traits in Irish Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 5413–5422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brotherstone, S.; White, L.M.S.; Coffey, M.; Downes, S.H.; Mitchell, A.P.; Clifton-Hadley, R.S.; More, S.J.; Good, M.; Woolliams, J.A. Evidence of genetic assistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1234–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Carmichael, J. Bovine tuberculosis in the tropics with special reference to Uganda. Part I. *Vet. J.* **1941**, *97*, 329–339.
17. Ameni, G.; Aseffa, A.; Engers, H.; Young, D.; Gordon, S.; Hewinson, G.; Vordermeier, M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol.* **2007**, *14*, 1356–1361. [[CrossRef](#)]
18. Kadarmiden, H.N.; Ali, A.A.; Thomson, P.C.; Müller, B.; Zinsstag, J. Polymorphisms of the *SIC11A1* gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Anim. Genet.* **2011**, *42*, 656–658. [[CrossRef](#)]