

La genómica de las micobacterias

M.N. Viale⁽¹⁾, M.J. Zumárraga⁽¹⁾, F.R. Araújo⁽²⁾, A.M. Zarraga⁽³⁾,
A.A. Cataldi⁽¹⁾, M.I. Romano⁽¹⁾ & F. Bigi^{(1)*}

(1) Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Los Reseros y Nicolás Repetto, CP 1686 Hurlingham, Argentina

(2) Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Campo Grande, Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, Mato Grosso do Sul, DF-Brazil

(3) Instituto de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Independencia 641, Valdivia, Región de los Ríos, Chile

*Autor encargado de la correspondencia: bigi.fabiana@inta.gob.ar

Resumen

Las especies *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* son los agentes causales de la tuberculosis y la paratuberculosis en animales, respectivamente. Además, ambas micobacterias, pero fundamentalmente *M. bovis*, son importantes para la salud pública, ya que pueden infectar a los humanos. Debido a esto último y al impacto de la tuberculosis y la paratuberculosis en la producción animal, en los últimos años se ha producido un avance significativo en los conocimientos de ambos agentes patógenos y de la interacción con sus hospedadores. En este artículo describiremos la contribución de la genómica y la genómica funcional a los estudios de evolución, virulencia, epidemiología y diagnóstico de ambas micobacterias patógenas.

Palabras clave

Diagnóstico – Epidemiología – Evolución – Genómica – Micobacterias – Paratuberculosis – Tuberculosis – Virulencia.

Introducción

El género *Mycobacterium* engloba agentes patógenos conocidos que causan enfermedades graves, como la tuberculosis o la lepra de los mamíferos. Muchas especies patógenas de este género se encuentran en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y causan tuberculosis en varios mamíferos, incluido el ser humano. Las especies del MTBC y sus hospedadores principales, que se indican entre paréntesis, son: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium africanum* (humanos), *Mycobacterium bovis* (bovinos), *Mycobacterium microti* (topillos), *Mycobacterium canettii* (humanos y animales), *Mycobacterium caprae* (rumiantes y humanos), *Mycobacterium pinnipedii* (mamíferos marinos), *Mycobacterium orygis* (animales y humanos en África y Asia), *Mycobacterium suricattae* (suricatas) y *Mycobacterium mungi* (mangostas).

Otro importante grupo de micobacterias lo compone el complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Los miembros de este complejo comprenden desde micobacterias ambientales, que causan infecciones oportunistas en humanos inmunocomprometidos, hasta agentes patógenos de aves y otros animales de interés pecuario. El MAC está formado por las subespecies *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y

M. avium subsp. *paratuberculosis* (MAP). La especie más importante en veterinaria es MAP, fundamentalmente por causar la paratuberculosis, una enteritis granulomatosa que genera enormes consecuencias económicas en la producción de rumiantes y que tiene potencial zoonótico porque puede causar la enfermedad de Crohn en humanos (1, 2).

M. bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina y una de las dos especies del género *Mycobacterium*, junto con MAP, de mayor impacto en la producción pecuaria. Por este motivo, en este artículo describimos la contribución de las herramientas genómicas al estudio de ambas especies.

Evolución

La secuenciación masiva de genomas ha permitido identificar al menos 150 especies del género *Mycobacterium*, que se dividen en dos grandes grupos: las micobacterias de crecimiento rápido, entre las que se encuentra la mayoría de las especies saprófitas de vida libre ampliamente distribuidas en el medio ambiente, y las de crecimiento lento, que incluyen las especies de los complejos MTBC y MAC, así como *M. intracellulare*, todas ellas agentes patógenos de mamíferos y aves (3).

La comparación de genomas de especies de micobacterias con otras especies relacionadas filogenéticamente, como *Corynebacterium* o *Streptomyces*, indicaría que una particularidad del género *Mycobacterium* es la expansión de genes del metabolismo de lípidos. Asimismo, entre especies de micobacterias patógenas y de vida libre se produjo una expansión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos saturados, genes relacionados con el molibdeno, y genes relacionados con la reparación, recombinación y replicación del ADN, en el caso de las primeras. Es probable que, en sus orígenes, el genoma de las micobacterias se modelara por transferencia genética y duplicación de genes (4). Sin embargo, y a diferencia de lo que se postula para algunas especies de micobacterias no tuberculosas (5), según lo observado en estudios genómicos (6) prácticamente no existe intercambio genético entre miembros del MTBC.

Debido a su gran variedad de hospedadores, inicialmente la especie *M. bovis* se propuso como el ancestro común del que derivaron agentes patógenos con nichos biológicos restringidos, como *M. tuberculosis*. Sin embargo, a partir de la secuenciación del primer genoma de *M. tuberculosis*, el de la cepa H37Rv, se planteó un nuevo escenario evolutivo para el MTBC. De acuerdo con el análisis genómico de regiones diferenciales entre especies, se estableció como ancestro común del MTBC a *M. tuberculosis* (7). Posteriormente, la secuenciación de genomas confirmó este escenario evolutivo, con *M. tuberculosis* como la más ancestral, seguida de *M. bovis* y, por último, del bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

La secuencia genómica completa de *M. bovis* se publicó en junio de 2003 (8), cinco años después de la publicación de la secuencia genómica de *M. tuberculosis* (9). El genoma de *M. bovis* es en más de un 99,95% idéntico al de *M. tuberculosis*, pero posee siete deleciones de tamaños comprendidos entre 1 y 12,7 kb y que se denominan RD (*region deleted*). Así, en términos generales, se podría establecer que la principal fuerza evolutiva que modeló el genoma de *M. bovis* ha sido la deleción génica. Es interesante el hallazgo que demuestra que muchos de los genes ausentes o alterados en *M. bovis* lo están también en *M. leprae*, un agente patógeno intracelular obligado que sufrió una reducción genómica considerable (8).

A pesar de los importantes avances logrados en el conocimiento de los mecanismos evolutivos que llevaron al surgimiento de las especies del MTBC y, en particular, de *M. bovis*, todavía es difícil explicar cómo esta bacteria, un microorganismo cuyo genoma ha sufrido fundamentalmente pérdida de regiones genómicas y que no posee genes exclusivos, habita un nicho biológico más amplio que su ancestro, *M. tuberculosis*. Seguramente, parte de la respuesta se encuentre en las más de 1.200 mutaciones de nucleótido único (polimorfismos de nucleótido

único: SNP) en regiones codificantes o genes que diferencian a *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Los genes más variables entre ambas especies son aquellos relacionados con proteínas de la pared y secretadas. En particular, se observa una variación muy extensa en los genes relacionados con las familias de proteínas PE-PGRS y PPE (8). Estas proteínas se expresan en la superficie de las micobacterias y se cree que proporcionan en gran medida la variación antigénica que provoca las diferentes respuestas inmunitarias frente a *M. tuberculosis*, más del 10% de cuyo genoma está formado por estos genes (10). En *M. bovis* también están afectados algunos de los genes de la familia de antígenos ESAT-6. La proteína ESAT-6 es un poderoso antígeno estimulador de la respuesta celular de tipo T y forma parte de una familia de más de 20 proteínas, entre las que se encuentran otros antígenos de tipo T, como CFP10 y CFP7 (11). Debido a su efecto amplificador, también es destacable el hallazgo de variantes génicas o mutaciones en genes que codifican reguladores transcripcionales y que determinan diferencias entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. En un total de 206 reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes, identificamos 19 genes con uno o más SNP no sinónimos (datos no publicados) y un gen que codifica un regulador truncado (*Rv0931c*) en *M. bovis* (12). Asimismo, recientemente se ha propuesto que en la mayoría de las cepas de *M. bovis* una mutación en el gen *phoR* podría explicar la baja transmisión de esta especie a los humanos. PhoR y PhoP conforman un sistema de dos componentes que activa la expresión de numerosas proteínas relevantes para la interacción de *M. tuberculosis* con el hospedador (13). También es relevante el alto nivel de expresión de los antígenos humorales MPB70 y MPB83 en el bacilo bovino con respecto al humano debido a una mutación en un gen que codifica una proteína reguladora de la expresión génica (14), así como los polimorfismos entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* en cuanto a varios genes involucrados en la síntesis o transporte de lípidos complejos (8).

En los últimos años, la secuenciación masiva de ARN (que ha generado el denominado transcriptoma) también ha contribuido al conocimiento de los procesos evolutivos que llevaron a la especiación y a la adaptación a los distintos nichos biológicos de las micobacterias. Los estudios transcriptómicos entre dos especies de linajes relativamente cercanos, *M. bovis* y *M. marinum* (esta última considerada una especie con características genómicas del tipo de las micobacterias ambientales y con una gran variedad de hospedadores), si bien muestran un alto grado de conservación en sus transcriptomas, sugieren que una importante fuerza evolutiva que diferenció ambos transcriptomas fue el hecho de que hubiera más regiones promotoras (cajas -10) en *M. bovis* que en *M. marinum* (15). Entre las especies evolutivamente muy cercanas y del mismo complejo, como *M. bovis* y *M. tuberculosis*, las diferencias a nivel de transcriptoma se deben fundamentalmente a SNP en las regiones promotoras (15). Por otro lado, la combinación de análisis genómicos y transcriptómicos ha

permitido descubrir que la presencia de SNP en las cadenas antisentido lleva a la producción de ARN no codificantes que regulan la expresión génica a través de mecanismos de degradación o inhibición de la transcripción de sus ARNm complementarios (16).

En cuanto al complejo *M. avium*, el primer genoma completamente descifrado fue el de la cepa bovina *M. paratuberculosis* K-10 (17). El genoma de la misma es un cromosoma circular de 4 829 781 pares de bases (pb) y codifica 4 350 marcos de lectura abiertos (ORF), 45 ARNt y un operón de ARNr. Se sabe que la principal diferencia entre *MAP* y los otros miembros del MAC es la presencia de entre 14 y 18 copias de la secuencia de inserción (IS) IS900 a lo largo de todo su genoma (18). Esta secuencia de 1.451 pb se convirtió en una herramienta muy útil para el diagnóstico diferencial de esta micobacteria, y tanto fue así que el análisis de los patrones de polimorfismo de esta secuencia permitió subclasificar a *MAP* en los tipos I o *MAP-S* (frecuente en ovinos) y II o *MAP-C* (frecuente en bovinos y caprinos). Existe un tercer tipo de *MAP* originalmente aislado de un bisonte en EE.UU. (19). Este tipo, denominado «tipo *Bison*», también se ha aislado en la India de bisontes y humanos (20).

A partir de la secuenciación de varias cepas del MAC, se estableció el probable escenario evolutivo de los miembros de este complejo. Uno de los modelos propone una primera fase en la que un clon ancestral de *M. hominissuis* evoluciona a través de inversiones en el genoma, así como por adquisición y pérdida de secuencias genómicas, originando dos clones patógenos independientes. Uno contiene *M. avium* y *M. hominissuis*, y el otro origina el progenitor de *MAP*, también conocido como proto-*MAP*. En una segunda fase, los dos principales linajes de *MAP*, *MAP-S* y *MAP-C*, surgirían tras eventos genómicos independientes a partir del clon original de proto-*MAP* (21). En un escenario evolutivo ligeramente diferente se propone que la cepa ancestral común *M. hominissuis* originaría la cepa *MAP-S* y que, a continuación, tendría lugar un segundo evento genómico que daría lugar a *MAP-C* (22). Un análisis ulterior, que se basó en la comparación de la secuencia de inserción IS1311 y cuyo objetivo era comprender la evolución del tipo *Bison*, confirmaría la última hipótesis, es decir, que *M. hominissuis* es la cepa progenitora que originó *MAP-S*, y que esta evolucionó al linaje *MAP-C*, dando lugar posteriormente al tipo *Bison* de EE.UU. y, luego, al tipo *Bison* de la India (23).

Virulencia

A pesar de su estrecha relación genética, los miembros del MTBC poseen un perfil de virulencia muy variado. El efecto de la virulencia en la patogenicidad, en el diagnóstico y en la eficacia de las vacunas se ha estudiado exhaustivamente

en *M. tuberculosis* (24, 25, 26); sin embargo, todavía se dispone de muy poca información relativa a *M. bovis*.

Existen numerosos trabajos cuyo objetivo es relacionar la virulencia de una especie o cepa con su perfil genético. Un ejemplo es el estudio comparativo entre dos cepas de *M. bovis* (04-303 y 534) aisladas de un jabalí de La Pampa y de un bovino de la provincia de Santa Fé, ambas regiones en Argentina. Si bien las dos cepas están filogenéticamente relacionadas, presentaron un fenotipo de virulencia muy diferente cuando se probaron en diversos hospedadores, ya que la cepa aislada del jabalí mostró una virulencia exacerbada (27, 28). Continuando con los estudios comparativos entre ambas, se definieron las diferencias en sus transcriptomas *in vitro* (29). Así, mediante técnicas de microchips de ADN y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se demostró que los genes *mce4D*, *Mb2607/Mb2608* y *Mb3706c* estaban sobreexpresados en la cepa virulenta 04-303, mientras que *alkB*, *Mb3277c* y *Mb1077* estaban sobreexpresados en la cepa atenuada 534. Además, se identificaron 49 genes que se expresaban de forma distinta en ambas cepas, un total de 35 genes se expresaban más en la cepa virulenta y 14 genes se expresaban más en la atenuada. La mayoría de los genes cuya expresión varía según la cepa, durante el cultivo *in vitro* mostraron la misma expresión diferencial dentro del macrófago bovino. Estos resultados indicarían que existen diferencias en los patrones de expresión génica que podrían explicar las diferencias fenotípicas en la virulencia de ambas cepas. Posteriormente, los genomas de estas dos cepas argentinas se secuenciaron (30, datos aun no publicados), y a partir de estos datos se analizaron las secuencias de 345 genes relacionados con la virulencia usando el genoma AF2122/97 como cepa de referencia. Se logró identificar mutaciones en 11 de estos genes en la cepa 04-303 y 15 en la cepa 534, respecto a AF2122/97. Las mutaciones no sinónimas que predicen cambios de aminoácidos se localizaron en los genes *hrcA*, *hpx* y *esat6* de la cepa virulenta 04-303, y en los genes *irtA*, *pks10*, *clgR* y *tetR* de la cepa atenuada 534. La mutación en *hrcA* de la cepa 04-303 parece ser particularmente importante, ya que codifica el represor transcripcional de shock térmico HrcA. Este regulador transcripcional participa en el control transcripcional de la familia de proteínas de shock térmico Hsp60/GroES (31), consideradas relevantes para la virulencia de varios agentes patógenos (32).

A pesar de los intensos esfuerzos de investigación, todavía hay poca información sobre las bases moleculares de la patogenicidad de *MAP*. En cuanto a las diferencias entre *MAP* y los otros miembros del MAC y del MTBC, una de las más destacables es la ausencia de producción de micobactina (un compuesto sideróforo) en *MAP*. En *M. tuberculosis*, se describió que el transporte de hierro se asocia a un grupo de diez genes (*mbtA* a la J) (33). El análisis del genoma de *MAP* reveló que el primero de los diez genes, *mbtA*, es

más corto que en *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. avium*. Se cree el truncamiento de este gen, el cual desempeña una función crucial en la cascada de reacciones que dan lugar a la producción de micobactina, es el motivo por el que la producción de este compuesto está atenuada en *MAP* (17), lo cual hace necesario añadirlo al medio de cultivo que se usa para el crecimiento *in vitro*.

Otra diferencia de *MAP* con respecto a *M. tuberculosis* es que tiene un menor número de proteínas de la familia PE/PPE. En *MAP*, solamente existen seis genes codificantes de proteínas PE y 36 genes que codifican proteínas PPE homólogos (lo cual constituye el 1% del genoma), en comparación con los 38 y 68 que existen en *M. tuberculosis*, respectivamente (17). En *MAP* tampoco se observan los genes codificantes de la subfamilia de proteínas PE-PGRS, lo cual puede sugerir una respuesta inmunitaria más escasa y menos variable que en *M. tuberculosis* y en *M. bovis*.

Entre los factores de virulencia del género *Mycobacterium* destacan los genes *mce*, cuyos productos de expresión génica son esenciales para la entrada celular y la supervivencia en el interior de los macrófagos (34, 35, 36, 37, 38, 39). En *MAP*, los genes *mce* se encuentran formando ocho operones que están distribuidos a lo largo de todo el genoma, de los cuales *mce5* y *mce7*, al igual que en *M. smegmatis*, están presentes en dos copias. Una comparación entre el genoma de *MAP* K10 y el genoma de otros integrantes del MAC reveló diferencias significativas en varias regiones del genoma. Una de estas regiones incluye cuatro ORF del genoma de *MAP* (*MAP2189*, *MAP2190*, *MAP2192* y *MAP2193*), homólogos respecto a la familia *mce*, que se clasificaron como divergentes en el genoma de las cepas del MAC no pertenecientes a la subespecie paratuberculosis (40). Esto podría conferir a *MAP* una ventaja específica en cuanto a la infección de macrófagos y/o a los mecanismos de virulencia. De hecho, existe un trabajo reciente en el que se describe que una mutante natural de *MAP* con una delección de una región de 16 kb que incluye un operón *mce* entero y genes PE/PPE muestra una reducción en su capacidad de sobrevivir en diferentes modelos celulares, lo cual respalda la teoría de que estos genes son fundamentales para la virulencia de *MAP* (41).

Otro factor de virulencia muy importante en el género *Mycobacterium* es el de los ácidos micólicos de su pared celular, responsables de la entrada en las células hospedadoras y de suprimir o eludir los mecanismos de defensa del sistema inmunitario. En un análisis del genoma de *MAP*, se encontraron aproximadamente 80 genes más que en *M. tuberculosis* presuntamente implicados en el metabolismo lipídico. Esta diferencia entre *MAP* y *M. tuberculosis* indica que podría haber variaciones en el metabolismo y en la biosíntesis de lípidos que pueden desempeñar un papel en la presencia/ausencia de antígenos en la superficie celular, lo cual afectaría a los mecanismos de defensa inmunitaria del hospedador (17).

Epidemiología molecular

El método de referencia para la tipificación de *M. tuberculosis* es el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando como sonda la secuencia de inserción *IS6110*. Sin embargo, como la mayoría de las cepas de *M. bovis* poseen una única copia de este elemento, este método tiene poca utilidad. Con otras sondas, como la de repeticiones directas (DR) o las del tipo polimorfismo de regiones ricas en guanina y citocina (PGRS) aumenta la diferenciación, aunque también la complejidad de la interpretación de los resultados.

La epidemiología molecular de la tuberculosis bovina se ha facilitado con la implementación de técnicas basadas en la PCR, ya que se ha reducido el tiempo necesario para obtener los resultados, no se requieren grandes cantidades de ADN para su realización y, en algunos casos, se puede llevar a cabo directamente con material clínico sin previo aislamiento. Una de las más difundidas es la técnica de hibridación reversa de espilogotipificación (42). La presencia o ausencia de secuencias polimórficas, denominadas «espaciadores», definen patrones de hibridación o espilogotipos y permiten la diferenciación interespecie e intraespecie dentro del MTBC (42). La espilogotipificación es la mejor opción para estudios a gran escala porque permite establecer relaciones distantes en el tiempo. Así, se ha identificado un espilogotipo (SB0140) predominante en aquellos países que han tenido relaciones comerciales con el Reino Unido (43) y que, junto con su ancestro, el SB0130, constituye el complejo clonal Europa 1, ambos sin el espaciador 11 (44). También se han descrito otros complejos clonales, como el Europa 2, dominante en la península Ibérica y que se caracteriza por la ausencia del espaciador 21 (45); el África 1, identificado por la ausencia del espaciador 30 y prevalente en distintos países del oeste de África (46), y el África 2, carente de los espaciadores tres a siete y que se encuentra en el este de África (47).

Para establecer asociaciones recientes en el tiempo es necesaria la utilización de marcadores más discriminatorios, como las repeticiones en tándem de número variable (VNTR), en concreto, las principales repeticiones polimórficas en tándem (MPTR) (48), las repeticiones exactas en tándem (ETR) (49, 50) y las unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU) (51). El poder discriminatorio máximo se logra combinando 24 loci, que son MIRU2, MIRU4 (ETR D); MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27 (QUB5), MIRU31 (ETR E), MIRU39, MIRU40, ETR A, ETR B, ETR C, Mtub04, Mtub21, Mtub29, Mtub30, Mtub34, Mtub39, QUB11B, QUB26 y QUB4156 (52), aunque con 15 se logra el 96% del total de la resolución. Recientemente, este esquema se ha optimizado para muestras de lavados broncoalveolares (53). También se han descrito otros

paneles de VNTR reducidos para *M. bovis*, dependiendo de la estructura poblacional y de la situación epidemiológica de cada región (54, 55). La genotipificación permite resolver casos concretos. Precisamente, en Argentina se ha podido demostrar por primera vez la transmisión de un mismo clon de *M. bovis* entre dos humanos (56).

La secuenciación completa de genomas (WGS) es una nueva herramienta que podría incorporarse a los programas de control y vigilancia de la tuberculosis, pues en *M. tuberculosis* la tasa de mutación del genoma es baja, de 0,39 SNP por genoma al año (57). En comparación la capacidad discriminatoria de los métodos moleculares tradicionales es baja, en particular en regiones donde se ha alcanzado una prevalencia baja. La WGS es rápida y confiable, aunque aún de alto costo; en ocasiones, la información que genera se almacena en bases de datos públicas (TB Database: www.tbdb.org, Wellcome Trust Sanger Institute: www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/mycobacterium.html, TubercuList: genolist.pasteur.fr/TubercuList, BoviList: genolist.pasteur.fr/BoviList, NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome). Además, informa respecto de la fisiología, el perfil de virulencia y la resistencia a los fármacos que presenta el agente patógeno prevalente, por lo que se está incorporando rápidamente como herramienta para el diagnóstico y los estudios epidemiológicos.

El análisis simultáneo de SNP de distintos genes se conoce como tipificación multilocus de secuencias (MLST) y permite establecer relaciones filogenéticas y epidemiológicas entre distintas cepas. En las micobacterias, el MLST se ha utilizado principalmente en *M. tuberculosis*, siendo todavía escasa la información relativa a *M. bovis*. Asimismo, hasta el momento, la información generada tiene más utilidad desde el punto de vista filogenético que epidemiológico. Consiste en la secuenciación de genes considerados esenciales, y a partir de las cepas correspondientes se detectan los distintos alelos y se establece un perfil alélico. Un esquema de MLST se aplicó a cepas de *M. tuberculosis* (58), pero para la discriminación a nivel de cepa no resultó tan bueno como el IS6110-RFLP, aunque sí fue mejor que la espoligotipificación (58). En un trabajo donde se utilizó un esquema de SNP propuesto previamente (59), se pudieron clasificar las cepas de *M. bovis* en tres linajes principales, y se distinguieron las cepas virulentas de *M. bovis* de la cepa *M. bovis* BCG, el bacilo de Calmette-Guérin (60). Asimismo, hay que tener en cuenta que, como consecuencia de la evolución convergente, puede producirse homoplasia tanto con la espoligotipificación como con los VNTR, y este es el motivo por el que los SNP son particularmente útiles para definir linajes de cepas (61).

La combinación de la PCR para el gen *hsp65* seguida de la restricción enzimática (PRA) se utiliza para diferenciar micobacterias a nivel de especie (62). Sin embargo, no permite diferenciar entre bacterias del MAC ni tampoco

del complejo *M. tuberculosis*. Un trabajo más reciente, en el cual se usó un fragmento más extenso del gen, permitió diferenciar MAP de otras bacterias del MAC, e incluso diferenciar entre MAP-C y MAP-S (63).

El análisis del RFLP con la secuencia de inserción IS900 se ha aplicado mucho para la tipificación de MAP (64, 65, 66). Sin embargo, con la determinación de los MIRU-VNTR se obtiene un mayor polimorfismo que con el RFLP. Se han identificado distintos loci MIRU-VNTR en los genomas del MAC, con diferente poder discriminatorio, lo cual es de gran importancia para la epidemiología de la paratuberculosis (67, 68, 69, 70, 71, 72).

Los SNP son los polimorfismos más comunes en el MAC. Su estudio mediante la MLST de genes conservados que codifican enzimas o proteínas estructurales ha permitido determinar la variabilidad entre las subespecies y las cepas del MAC (73).

Otra de las herramientas para la diferenciación y subtipificación de MAP es el análisis de repeticiones multilocus de secuencia corta (MLSSR), con el que se alcanza un alto poder discriminatorio (74, 75). En un trabajo basado en la variabilidad alélica de 11 MLSSR estudiadas, se pudieron diferenciar 33 cepas de MAP de distintas zonas geográficas y diferentes hospedadores, pertenecientes a 20 subtipos (74). En otro análisis de MLSSR, realizado en EE.UU., en un total de 211 cepas de MAP y 56 de *M. avium* se pudieron detectar 61 genotipos de MAP, aunque el grado de diferenciación en *M. avium* fue bajo (76).

La combinación de diferentes técnicas puede aportar mayor información epidemiológica acerca de MAP, como describe un trabajo en el que se analizaron, mediante la determinación de MIRU-VNTR y MLSSR, cepas de distintos hospedadores de Sudamérica. Se detectaron siete genotipos MIRU-VNTR y siete MLSSR, que combinados dieron un total de nueve genotipos. Los resultados revelaron la predominancia de un genotipo MIRU-VNTR (INMV1) y un genotipo MLSSR (genotipo A), que además son comunes en EE.UU., y en Europa (77). En otro estudio, realizado en Alemania y Luxemburgo, 91 cepas de ganado lechero sintomático se genotipificaron también por MIRU-VNTR y MLSSR, lo cual permitió detectar 11 genotipos MIRU-VNTR y seis MLSSR, que al combinarlos rindieron un total de 25 genotipos (78). Estos trabajos demuestran la utilidad de estas técnicas para la genotipificación de MAP y su potencial para aplicarlas en programas de control.

Un desafío importante en los países en desarrollo es el de contar con políticas de gobierno que permitan aplicar estas tecnologías en los programas de vigilancia, control y erradicación de la tuberculosis y la paratuberculosis bovina.

Diagnóstico

La gran mayoría de los trabajos sobre la detección de *M. bovis* mediante PCR se basan en la identificación de dos secuencias de inserción que se identificaron en la era pregenómica, IS6110 e IS1081. La secuencia IS6110 se adoptó para el diagnóstico de la tuberculosis humana, ya que *M. tuberculosis* a menudo tiene múltiples copias de la misma en su genoma. Paradójicamente, la amplificación basada en IS6110 resultó ser más sensible para detectar *M. bovis*, que tiene una única copia de esta secuencia, que la basada en IS1081, de la cual el microorganismo cuenta con cinco copias (79).

Existen varios informes de detección de *M. bovis* basados en PCR que, además, permiten la diferenciación simultánea de otros miembros del complejo *M. tuberculosis*. Por ejemplo, una PCR múltiple basada en la amplificación simultánea del operón de ARNr (conservado en todas las micobacterias), del gen *murA* (conservado en todo el complejo *M. tuberculosis*) y de la región RD4 (ausente solo en *M. bovis*), permitió distinguir correctamente la pertenencia al género *Mycobacterium*, al MBTC y, específicamente, a *M. bovis* (80).

Una exploración bioinformática completa de las secuencias genómicas dio origen a SeekTB, una PCR cuantitativa (qPCR) en dos etapas en la que se emplean 16 pares de oligonucleótidos y que es capaz de distinguir entre los ocho miembros del complejo *M. tuberculosis* (81). Por otro lado, nuestro grupo demostró la ausencia de RD7 en *M. bovis* en relación a *M. tuberculosis* (82). Esta diferencia genómica se empleó para establecer una PCR para distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis* en los casos en los que se sospeche de tuberculosis de origen zoonótico o de tuberculosis bovina causada por *M. tuberculosis* (83). Con este método, sin embargo, no se puede distinguir *M. bovis* de *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* ni *M. africanum*, ya que todas estas especies también carecen de RD7.

Mediante estudios genómicos se ha demostrado que la región TbD1 está presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* excepto en las cepas de *M. tuberculosis* conocidas como «modernas», que son la mayoría de las que causan tuberculosis humana en América, Europa y el norte de Asia. De esta manera, la PCR basada en TbD1 va dirigida a englobar todas las micobacterias que causan tuberculosis en animales (84). Recientemente, se ha descrito la identificación simultánea de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y al complejo *M. avium* mediante qPCR tetraplex en tubo (85). En este método, se emplea IS1311 para la identificación del complejo *M. avium*, *devR* para identificar el complejo *M. tuberculosis* y el espaciador interno transcrito (ITS) ubicado entre los ARNr 16S y 23S para identificar el género *Mycobacterium*.

En cuanto a la paratuberculosis, si bien el cultivo bacteriano que se lleva a cabo a partir de materia fecal es la prueba de referencia para el diagnóstico de MAP, la confirmación definitiva de su presencia suele basarse en una PCR. Las técnicas de detección basadas en PCR se utilizan para la localización tanto en materia fecal como en leche (86, 87, 88, 89). La secuencia específica más utilizada para lograr un diagnóstico es IS900. Se han diseñado diferentes técnicas basadas en esta secuencia, como la hibridación *in situ*, el análisis de polimorfismos del genoma usando esta sonda como marcador, PCR anidadas, la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), etc. También se han desarrollado métodos basados en la PCR en tiempo real, que además de detectar la presencia de la bacteria, son capaces de cuantificar la carga bacteriana de una muestra. En un trabajo en el que se empleó esta técnica, basada en IS900 y combinada con ISMap02, esta última una secuencia de inserción de MAP presente en seis copias por genoma, se observó una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la bacteria y se propuso como método interesante para los programas de control y erradicación de la paratuberculosis (90).

La predicción de antígenos por análisis genómico es una disciplina bien desarrollada. En estas estrategias se emplean programas con algoritmos que barren el genoma en busca de dominios con afinidad por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o de clase II. Empleando datos experimentales obtenidos con un antígeno modelo, ESAT6, se ha observado que el programa ProPred, que predice epítomos reconocidos por el CMH humano (HLA-DR), predice correctamente epítomos de antígenos específicos de *M. bovis* (91). Mediante estudios comparativos de los genomas micobacterianos disponibles en 2006, se han identificado 42 genes específicos de *M. bovis* (92). A partir de conjuntos de péptidos de las 42 proteínas correspondientes, se ha observado que Mb2890, Mb3895 y Mb2555 son las más antigénicas y con mayor especificidad. Sin embargo, ha habido reacciones cruzadas con MAP a pesar de que ninguna de las tres proteínas está codificada en esta especie. En otro estudio, a partir de un barrido bioinformático del genoma de *M. bovis* y un análisis bibliográfico, se seleccionaron las proteínas secretadas porque observaciones previas indicaban que las proteínas más antigénicas a menudo son las secretadas (93). Se identificaron 119 proteínas presuntamente secretadas, entre las cuales, varias de la familia ESX, que son antigénicas y están estrechamente relacionadas con la virulencia del complejo *M. tuberculosis*, mostraron una estimulación de los linfocitos Th1 (94).

Con el acceso a la secuencia de los genomas completos es sencillo identificar secuencias únicas de MAP para implementar o mejorar las pruebas de diagnóstico. Un análisis del genoma completo de la cepa K10 ha revelado unas 161 regiones genómicas únicas de MAP con posible

aplicación en el diagnóstico, siendo la mayor de 15,9 kb de longitud (17). De hecho, se ha comprobado la inmunogenicidad de algunas de las proteínas codificadas por estas regiones únicas (95, 96). De esta manera, la combinación de la información genómica, las herramientas moleculares y las pruebas inmunológicas proveen una gran ayuda en el diagnóstico diferencial de MAP.

Conclusiones

La secuenciación completa de los genomas de micobacterias patógenas y, en particular, del de *M. tuberculosis*, que se llevó a cabo en el año 1998, podría definirse como el punto de inflexión a partir del cual la generación de conocimientos sobre estos agentes patógenos y su interacción con sus hospedadores se ha desarrollado de forma excepcionalmente acelerada. Sin embargo, fue en la etapa previa, la pregenómica, en la que se sentaron las bases evolutivas del género *Mycobacterium* y se descifraron los principales mecanismos de virulencia de las especies

patógenas. Fueron también los estudios pregenómicos los que facilitaron el desarrollo de los métodos de tipificación molecular, que se han aplicado hasta la actualidad en los estudios epidemiológicos y en el diagnóstico. Quedan aún muchos interrogantes que se espera resolver a partir de la genómica, la transcriptómica y la biología de sistemas, fundamentalmente los relacionados con los procesos de interacción de las micobacterias con sus hospedadores y de adaptación a sus nichos biológicos. Se espera también que estas nuevas disciplinas de alto rendimiento contribuyan a la mejora de las herramientas para el control de las enfermedades, así como al desarrollo de vacunas de nueva generación y nuevos y mejores métodos de diagnóstico.

Agradecimientos

Este artículo se elaboró en el marco del proyecto INTA PNBIO1131034.

La génomique des mycobactéries

M.N. Viale, M.J. Zumárraga, F.R. Araújo, A.M. Zarraga, A.A. Cataldi, M.I. Romano & F. Bigi

Résumé

Les mycobactéries *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sont les agents étiologiques de la tuberculose et de la paratuberculose, respectivement. En outre, les deux mycobactéries (mais plus particulièrement *M. bovis*) peuvent infecter l'être humain et jouent donc un rôle en santé publique. En raison de cette importance et des effets de la tuberculose et de la paratuberculose sur la production animale, de grands efforts ont été déployés pour faire avancer nos connaissances sur ces deux agents pathogènes et sur leurs interactions avec leurs hôtes. Les auteurs décrivent la contribution de la génomique et de la génomique fonctionnelle dans les études sur l'évolution, la virulence, l'épidémiologie et le diagnostic de ces deux mycobactéries pathogènes.

Mots-clés

Diagnostic – Épidémiologie – Évolution – Génomique – Mycobactéries – Paratuberculose – Tuberculose – Virulence.

Bibliografía

- Hermon-Taylor J. (2009). – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday scenario. *Gut Pathog.*, **1**, 15. doi:10.1186/1757-4749-1-15.
- Behr M.A. & Kapur V. (2008). – The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **24** (1), 17–21. doi:10.1097/MOG.0b013e3282f1dccc4.
- Behr M.A. (2013). – Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **783**, 81–91. doi:10.1007/978-1-4614-6111-1_4.
- Veyrier F.J., Dufort A. & Behr M.A. (2011). – The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends Microbiol.*, **19** (4), 156–161. doi:10.1016/j.tim.2010.12.008.
- Reva O., Korotetskiy I. & Ilin A. (2005). – Role of the horizontal gene exchange in evolution of pathogenic mycobacteria. *BMC Evol. Biol.*, **15** (Suppl. 1), S2. doi:10.1186/1471-2148-15-S1-S2.
- McGuire A.M., Weiner B., Park S.T., Wapinski I., Raman S., Dolganov G., Peterson M., Riley R., Zucker J., Abeel T., White J., Sisk P., Stolte C., Koehrsen M., Yamamoto R.T., Iacobelli-Martinez M., Kidd M.J., Maer A.M., Schoolnik G.K., Regev A. & Galagan J. (2012). – Comparative analysis of *Mycobacterium* and related actinomycetes yields insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *BMC Genomics*, **13**, 120. doi:10.1186/1471-2164-13-120.
- 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 the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99** (6), 3684–3689. doi:10.1073/pnas.052548299.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. & Hewinson R.G. (2003). – The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100** (13), 7877–7882. doi:10.1073/pnas.1130426100.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S. & Barry C.E. (1998). – Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537–544. doi:10.1038/31159.
- Mukhopadhyay S. & Balaji K.N. (2011). – The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*, **91** (5), 441–447. doi:10.1016/j.tube.2011.04.004.
- Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S.T. & Brosch R. (2004). – ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.*, **12** (11), 500–508. doi:10.1016/j.tim.2004.09.007.
- Peirs P., Parmentier B., De Wit L. & Content J. (2000). – The *Mycobacterium bovis* homologous protein of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase MbK (PknD) is truncated. *FEMS Microbiol. Lett.*, **188** (2), 135–139. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09184.x.
- Gonzalo-Asensio J., Malaga W., Pawlik A., Astarie-Dequeker C., Passemar C., Moreau F., Laval F., Daffé M., Martin C., Brosch R. & Guilhot C. (2014). – Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **111** (31), 11491–11496. doi:10.1073/pnas.1406693111.
- Said-Salim B., Mostowy S., Kristof A.S. & Behr M.A. (2006). – Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*. *Molec. Microbiol.*, **62** (5), 1251–1263. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05455.x.
- Dinan A.M., Tong P., Lohan A.J., Conlon K.M., Miranda-CasoLuengo A.A., Malone K.M., Gordon S.V. & Loftus B.J. (2014). – Relaxed selection drives a noisy noncoding transcriptome in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *MBio*, **5** (4), e01169-14. doi:10.1128/mBio.01169-14.
- Golby P., Nunez J., Witney A., Hinds J., Quail M.A., Bentley S., Harris S., Smith N., Hewinson R.G. & Gordon S.V. (2013). – Genome-level analyses of *Mycobacterium bovis* lineages reveal the role of SNPs and antisense transcription in differential gene expression. *BMC Genomics*, **14**, 710. doi:10.1186/1471-2164-14-710.
- Li L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A., May B.J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S. & Kapur V. (2005). – The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102** (35), 12344–12349. doi:10.1073/pnas.0505662102.
- Green E.P., Tizard M.L., Moss M.T., Thompson J., Winterbourne D.J., McFadden J.J. & Hermon-Taylor J. (1989). – Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*, **17** (22), 9063–9073. doi:10.1093/nar/17.22.9063.
- Whittington R.J., Marsh I.B. & Whitlock R.H. (2001). – Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Molec. Cell. Probes*, **15** (3), 139–145. doi:10.1006/mcpr.2001.0346.
- Singh A.V., Singh S.V., Sohal J.S. & Singh P.K. (2010). – Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recovered from suspected and Crohn's disease patients in India. *J. Communic. Dis.*, **42** (2), 91–100.

21. Alexander D.C., Turenne C.Y. & Behr M.A. (2009). – Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Bacteriol.*, **191** (3), 1018–1025. doi:10.1128/JB.01340-08.
22. Bannantine J.P., Wu C.W., Hsu C., Zhou S., Schwartz D.C., Bayles D.O., Paustian M.L., Alt D.P., Sreevatsan S., Kapur V. & Talaat A.M. (2012). – Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics*, **13**, 89. doi:10.1186/1471-2164-13-89.
23. Sohal J.S., Singh S.V., Singh P.K. & Singh A.V. (2010). – On the evolution of 'Indian Bison type' strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiol. Res.*, **165** (2), 163–171. doi:10.1016/j.micres.2009.03.007.
24. Gagneux S. & Small PM. (2007). – Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.*, **7** (5), 328–337. doi:10.1016/S1473-3099(07)70108-1.
25. Kato-Maeda M., Shanley C.A., Ackart D., Jarlsberg L.G., Shang S., Obregon-Henao A., Harton M., Basaraba R.J., Henao-Tamayo M., Barrozo J.C., Rose J., Kawamura L.M., Coscolla M., Fofanov V.Y., Koshinsky H., Gagneux S., Hopewell P.C., Ordway D.J. & Orme I.M. (2012). – Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin. Vaccine Immunol.*, **19** (8), 1227–1237. doi:10.1128/CVI.00250-12.
26. Via L.E., Weiner D.M., Schimel D., Lin P.L., Dayao E., Tankersley S.L., Cai Y., Coleman M.T., Tomko J., Paripati P., Orandle M., Kastenmayer R.J., Tartakovsky M., Rosenthal A., Portevin D., Eum S.Y., Lahouar S., Gagneux S., Young D.B., Flynn J.L. & Barry C.E. 3rd (2013). – Differential virulence and disease progression following *Mycobacterium tuberculosis* complex infection of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Infect. Immun.*, **81** (8), 2909–2919. doi:10.1128/IAI.00632-13.
27. Aguilar León D., Zumárraga M.J., Jiménez Oropeza R., Gioffré A.K., Bernardelli A., Orozco Estévez H., Cataldi A.A. & Hernández Pando R. (2009). – *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin. Experim. Immunol.*, **157** (1), 139–147. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03923.x.
28. Meikle V., Bianco M.V., Blanco F.C., Gioffré A., Garbaccio S., Vagnoni L., Di Rienzo J., Canal A., Bigi F. & Cataldi A. (2011). – Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. *BMC Vet. Res.*, **7**, 37. doi:10.1186/1746-6148-7-37.
29. Blanco F.C., Nunez-García J., García-Pelayo C., Soria M., Bianco M.V., Zumárraga M., Golby P., Cataldi A.A., Gordon S.V. & Bigi F. (2009). – Differential transcriptome profiles of attenuated and hypervirulent strains of *Mycobacterium bovis*. *Microbes Infect.*, **11** (12), 956–963. doi:10.1016/j.micinf.2009.06.006.
30. Nishibe C., Canevari Castelhão A.B., Dalla Costa R., Pinto B.J., Varuzza L., Cataldi A.A., Bernardelli A., Bigi F., Blanco F.C., Zumárraga M.J., Almeida N.F. & Araújo F.R. (2013). – Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* 04-303, a highly virulent strain from Argentina. *Genome Announc.*, **1** (6), e00931-13. doi:10.1128/genomeA.00931-13.
31. Stewart G.R., Wernisch L., Stabler R., Mangan J.A., Hinds J., Laing K.G., Young D.B. & Butcher P.D. (2002). – Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology*, **148**, 3129–3138. doi:10.1099/00221287-148-10-3129.
32. Lathigra R.B., Butcher P.D., Garbe T.R. & Young D.B. (1991). – Heat shock proteins as virulence factors of pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **167**, 125–143. doi:10.1007/978-3-642-75875-1_8.
33. Quadri L.E., Sello J., Keating T.A., Weinreb P.H. & Walsh C.T. (1998). – Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.*, **5** (11), 631–645. doi:10.1016/S1074-5521(98)90291-5.
34. Parker S.L., Tsai Y.L. & Palmer C.J. (1995). – Comparison of PCR-generated fragments of the *mce* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2** (6), 770–775.
35. Flesselles B., Anand N.N., Remani J., Loosmore S.M. & Klein M.H. (1999). – Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **177** (2), 237–242. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13738.x.
36. Haile Y., Caugant D.A., Bjune G. & Wiker H.G. (2002). – *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (*mce*) homologs in *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **33** (2), 125–132. doi:10.1111/j.1574-695X.2002.tb00581.x.
37. Gioffré A., Infante E., Aguilar D., Santangelo M.P., Klepp L., Amadio A., Meikle V., Etchechoury I., Romano M.I., Cataldi A., Hernández R.P. & Bigi F. (2005). – Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect.*, **7** (3), 325–334. doi:10.1016/j.micinf.2004.11.007.
38. Casali N. & Riley L.W. (2007). – A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales* *mce* operons. *BMC Genomics*, **8**, 60. doi:10.1186/1471-2164-8-60.
39. El-Shazly S., Ahmad S., Mustafa A.S., Al-Attiyah R. & Krajci D. (2007). – Internalization by HeLa cells of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the *mce3* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, **56** (Pt 9), 1145–1151. doi:10.1099/jmm.0.47095-0.

40. Paustian M.L., Kapur V. & Bannantine J.P. (2005). – Comparative genomic hybridizations reveal genetic regions within the *Mycobacterium avium* complex that are divergent from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J. Bacteriol.*, **187** (7), 2406–2415. doi:10.1128/jb.187.7.2406-2415.2005.
41. Castellanos E., Aranaz A., de Juan L., Dominguez L., Linedale R. & Bull T.J. (2012). – A 16 kb naturally occurring genomic deletion including *mce* and PPE genes in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats with Johne's disease. *Vet. Microbiol.*, **159** (1–2), 60–68. doi:10.1016/j.vetmic.2012.03.010.
42. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. & van Embden J. (1997). – Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **35** (4), 907–914.
43. Cataldi A.A., Giofrè A., Santangelo M.P., Alito A., Caimi K., Bigi F., Romano M.I. & Zumárraga M. (2002). – The genotype of the principal *Mycobacterium bovis* in Argentina is also that of the British Isles: did bovine tuberculosis come from Great Britain? *Rev. Argent. Microbiol.*, **34** (1), 1–6.
44. Smith N.H., Berg S., Dale J., Allen A., Rodriguez S., Romero B., Matos F., Ghebremichael S., Karoui C., Donati C., da Conceição Machado A., Mucavele C., Kazwala R.R., Hilty M., Cadmus S., Ngandolo B.N., Habtamu M., Oloya J., Muller A., Milian-Suazo F., Andrievskaia O., Projahn M., Barandiarán S., Macías A., Müller B., Zanini M.S., Ikuta C.Y., Rodriguez C.A., Pinheiro S.R., Figueroa A., Cho S.N., Mosavari N., Chuang P.C., Jou R., Zinsstag J., van Soolingen D., Costello E., Aseffa A., Proaño-Perez E., Portaels F., Rigouts L., Cataldi A.A., Collins D.M., Boschioli M.L., Hewinson R.G., Ferreira Neto J.S., Surujballi O., Tadyon K., Botelho A., Zárraga A.M., Buller N., Skuce R., Michel A., Aranaz A., Gordon S.V., Jeon B.Y., Källenius G., Niemann S., Boniotti M.B., van Helden P.D., Harris B., Zumárraga M.J. & Kremer K. (2011). – European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Genet. Evol.*, **11** (6), 1340–1351. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.027.
45. Rodriguez-Campos S., Schürch A.C., Dale J., Lohan A.J., Cunha M.V., Botelho A., De Cruz K., Boschioli M.L., Boniotti M.B., Pacciarini M., Garcia-Pelayo M.C., Romero B., de Juan L., Domínguez L., Gordon S.V., van Soolingen D., Loftus B., Berg S., Hewinson R.G., Aranaz A. & Smith N.H. (2011). – European 2—a clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect. Genet. Evol.*, **12** (4), 866–872. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.004.
46. Müller B., Hilty M., Berg S., Garcia-Pelayo M.C., Dale J., Boschioli M.L., Cadmus S., Ngandolo B.N., Godreuil S., Diguimbaye-Djaibé C., Kazwala R., Bonfoh B., Njanpop-Lafourcade B.M., Sahraoui N., Guetarni D., Aseffa A., Mekonnen M.H., Razanamparany V.R., Ramarokoto H., Djønne B., Oloya J., Machado A., Mucavele C., Skjerve E., Portaels F., Rigouts L., Michel A., Müller A., Källenius G., van Helden P.D., Hewinson R.G., Zinsstag J., Gordon S.V. & Smith N.H. (2009). – African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J. Bacteriol.*, **191** (6), 1951–1960. doi:10.1128/JB.01590-08.
47. Berg S., Garcia-Pelayo M.C., Müller B., Hailu E., Asimwe B., Kremer K., Dale J., Boniotti M.B., Rodriguez S., Hilty M., Rigouts L., Firdessa R., Machado A., Mucavele C., Ngandolo B.N., Bruchfeld J., Boschioli L., Müller A., Sahraoui N., Pacciarini M., Cadmus S., Joloba M., van Soolingen D., Michel A.L., Djønne B., Aranaz A., Zinsstag J., van Helden P., Portaels F., Kazwala R., Källenius G., Hewinson R.G., Aseffa A., Gordon S.V. & Smith N.H. (2011). – African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. *J. Bacteriol.*, **193** (3), 670–678. doi:10.1128/JB.00750-10.
48. Frothingham R. & Meeker-O'Connell W.A. (1998). – Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, **144**, 1189–1196. doi:10.1099/00221287-144-5-1189.
49. Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S. & Skuce R. (2002). – Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, **40** (6), 2126–2133. doi:10.1128/JCM.40.6.2126-2133.2002.
50. Skuce R.A., McCorry T.P., McCarroll J.F., Roring S.M., Scott A.N., Brittain D., Hughes S.L., Hewinson R.G. & Neill S.D. (2002). – Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, **148**, 519–528. doi:10.1099/00221287-148-2-519.
51. Supply P., Mazars E., Lasjean S., Vincent V., Gicquel B. & Locht C. (2000). – Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molec. Microbiol.*, **36** (3), 762–771. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x.
52. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C. & van Soolingen D. (2006). – Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (12), 4498–4510. doi:10.1128/JCM.01392-06.

53. De Beer J.L., Akkerman O.W., Schürch A.C., Mulder A., van der Werf T.S., van der Zanden A.G., van Ingen J. & van Soolingen D. (2014). – Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J. Clin. Microbiol.*, **52** (5), 1338–1342. doi:10.1128/JCM.03436-13.
54. Rodriguez-Campos S., Navarro Y., Romero B., de Juan L., Bezos J., Mateos A., Golby P., Smith N.H., Hewinson G.R., Domínguez L., García-de-Viedma D. & Aranaz A. (2013). – Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J. Clin. Microbiol.*, **51** (11), 3658–3665. doi:10.1128/JCM.01271-13.
55. Bolado-Martínez E., Benavides-Dávila I., Candia-Plata M. del C., Navarro-Navarro M., Avilés-Acosta M. & Álvarez-Hernández G. (2015). – Proposal of a screening MIRU-VNTR panel for the preliminary genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Biomed. Res. Int.*, ArticleID:416479. doi:10.1155/2015/416479.
56. Etchehoury I., Echeverría Valencia G., Morcillo N., Sequeira M.D., Imperiale B., López M., Caimi K., Zumárraga M.J., Cataldi A. & Romano M.I. (2010). – Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health*, **57** (6), 375–381. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01233.x.
57. Sherman D.R. & Gagneux S. (2011). – Estimating the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *Nature Genet.*, **43**, 400–401. doi:10.1038/ng.815.
58. Lu B., Dong H.Y., Zhao X.Q., Liu Z.G., Liu H.C., Zhang Y.Y., Jiang Y. & Wan K.L. (2012). – A new multilocus sequence analysis scheme for *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed. Environ. Sci.*, **25** (6), 620–629. doi:10.3967/0895-3988.2012.06.003.
59. Garcia Pelayo M.C., Uplekar S., Keniry A., Mendoza Lopez P., Garnier T., Nunez Garcia J., Boschirolu L., Zhou X., Parkhill J., Smith N., Hewinson R.G., Cole S.T. & Gordon S.V. (2009). – A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis* strains and *M. bovis* BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG strains. *Infect. Immun.*, **77** (5), 2230–2238. doi:10.1128/IAI.01099-08.
60. Joshi D., Harris N.B., Waters R., Thacker T., Mathema B., Krieswirth B. & Sreevatsan S. (2012). – Single nucleotide polymorphisms in the *Mycobacterium bovis* genome resolve phylogenetic relationships. *J. Clin. Microbiol.*, **50** (12), 3853–3861. doi:10.1128/JCM.01499-12.
61. Comas I., Homolka S., Niemann S. & Gagneux S. (2009). – Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE*, **4** (11), e7815. doi:10.1371/journal.pone.0007815.
62. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C. & Bodmer T. (1993). – Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **31** (2), 175–178.
63. Turenne C.Y., Semret M., Cousins D.V., Collins D.M. & Behr M.A. (2006). – Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (2), 433–440. doi:10.1128/JCM.44.2.433-440.2006.
64. Moreira A.R., Paolicchi E., Morsella C., Zumarraga M., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Piet O., van Soolingen D. & Romano M.I. (1999). – Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet. Microbiol.*, **70** (3–4), 251–259. doi:10.1016/S0378-1135(99)00144-3.
65. Pavlik I., Bejcková L., Pavlas M., Rozsypalová Z. & Kosková S. (1995). – Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.*, **45** (4), 311–318. doi:10.1016/0378-1135(94)00130-O.
66. Dønne B., Pavlik I., Svastova P., Bartos M. & Holstad G. (2005). – IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet. Scand.*, **46** (1–2), 13–18. doi:10.1186/1751-0147-46-13.
67. Bull T.J., Sidi-Boumedine K., McMinn E.J., Stevenson K., Pickup R. & Hermon-Taylor J. (2003). – Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Molec. Cell. Probes*, **17** (4), 157–164. doi:10.1016/S0890-8508(03)00047-1.
68. Overduin P., Schouls L., Roholl P., van der Zanden A., Mahmmoud N., Herrewegh A. & van Soolingen D. (2004). – Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (11), 5022–5028. doi:10.1128/JCM.42.11.5022-5028.2004.
69. Thibault V.C., Grayon M., Boschirolu M.L., Hubbans C., Overduin P., Stevenson K., Gutierrez M.C., Supply P. & Biet F. (2007). – New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.*, **45** (8), 2404–2410. doi:10.1128/JCM.00476-07.
70. Inagaki T., Nishimori K., Yagi T., Ichikawa K., Moriyama M., Nakagawa T., Shibayama T., Uchiya K., Nikai T. & Ogawa K. (2009). – Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.*, **47** (7), 2156–2164. doi:10.1128/JCM.02373-08.
71. Castellanos E., Romero B., Rodríguez S., de Juan L., Bezos J., Mateos A., Domínguez L. & Aranaz A. (2010). – Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. *Vet. Microbiol.*, **144** (1-2), 118–126. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.028.

72. Biet F., Sevilla I.A., Cochard T., Lefrançois L.H., Garrido J.M., Heron I., Juste R.A., McLuckie J., Thibault V.C., Supply P., Collins D.M., Behr M.A. & Stevenson K. (2012). – Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.*, **12**, 264. doi:10.1186/1471-2180-12-264.
73. Turenne C.Y., Collins D.M., Alexander D.C. & Behr M.A. (2008). – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J. Bacteriol.*, **190** (7), 2479–2487. doi:10.1128/JB.01691-07.
74. Amonsin A., Li L.L., Zhang Q., Bannantine J.P., Motiwala A.S., Sreevatsan S. & Kapur V. (2004). – Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (4), 1694–1702. doi:10.1128/JCM.42.4.1694-1702.2004.
75. Sevilla I., Li L., Amonsin A., Garrido J.M., Geijo M.V., Kapur V. & Juste R.A. (2008). – Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC Microbiol.*, **8**, 204. doi:10.1186/1471-2180-8-204. doi:10.1186/1471-2180-8-204.
76. Harris N.B., Payeur J.B., Kapur V. & Sreevatsan S. (2006). – Short-sequence-repeat analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates collected from animals throughout the United States reveals both stability of loci and extensive diversity. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (8), 2970–2973. doi:10.1128/JCM.00584-06.
77. Fernández-Silva J.A., Abdulmawjood A., Akineden Ö. & Bülte M. (2012). – Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from South American countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **44** (6), 1123–1126. doi:10.1007/s11250-011-0060-6.
78. Fernández-Silva J.A., Abdulmawjood A., Akineden Ö., Dräger K., Klawonn W. & Bülte M. (2012). – Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a regional scale in Germany. *Res. Vet. Sci.*, **93** (2), 776–782. doi:10.1016/j.rvsc.2011.12.005.
79. Zumarraga M.J., Meikle V., Bernardelli A., Abdala A., Tarabla H., Romano M.I. & Cataldi A. (2005). – Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 232–238. doi:10.1177/104063870501700303.
80. Cobos-Marín L., Montes-Vargas J., Rivera-Gutierrez S., Licea-Navarro A., González-y-Merchand J.A. & Estrada-García I. (2012). – A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin. *Epidemiol. Infect.*, **130** (3), 485–490. doi:10.1017/S095026880300829X.
81. Reddington K., Zumla A., Bates M., van Soolingen D., Niemann S., Barry T. & O'Grady J. (2012). – SeekTB, a two-stage multiplex real-time-PCR-based method for differentiation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **50** (7), 2203–2206. doi:10.1128/JCM.00718-12.
82. Zumárraga M., Bigi F., Alito A., Romano M.I. & Cataldi A. (1999). – A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*, **145** (Pt 4), 893–897. doi:10.1099/13500872-145-4-893.
83. Mittal M., Chakravarti S., Sharma V., Sanjeeth B.S., Churamani C.P. & Kanwar N.S. (2014). – Evidence of presence of *Mycobacterium tuberculosis* in bovine tissue samples by multiplex PCR: possible relevance to reverse zoonosis. *Transbound. Emerg. Dis.*, **61** (2), 97–104. doi:10.1111/tbed.12203.
84. Araújo C.P., Osório A.L., Jorge K.S., Ramos C.A., Filho A.F., Vidal C.E., Roxo E., Nishibe C., Almeida N.F., Júnior A.A., Silva M.R., Neto J.D., Cerqueira V.D., Zumárraga M.J. & Araújo F.R. (2014). – Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS ONE*, **9** (3), e91023. doi:10.1371/journal.pone.0091023.
85. Sevilla I.A., Molina E., Elguezabal N., Pérez V., Garrido J.M. & Juste R.A. (2015). – Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **53** (3), 930–940. doi:10.1128/JCM.03168-14.
86. Wells S.J., Collins M.T., Faaberg K.S., Wees C., Tavornpanich S., Petrini K.R., Collins J.E., Cernicchiaro N. & Whitlock R.H. (2006). – Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13** (10), 1125–1130. doi:10.1128/CVI.00236-06.
87. Carvalho I.A., Silva V.O., Vidigal P.M., Silva A. Jr & Moreira M.A. (2012). – Genetic evaluation of IS900 partial sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Brazilian isolates from bovine milk. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, **44** (7), 1331–1334. doi:10.1007/s11250-012-0117-1.
88. Mundo S.L., Gilardoni L.R., Hoffman F.J. & Lopez O.J. (2013). – Rapid and sensitive method to identify *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk by DNA methylase genotyping. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79** (5), 1612–1618. doi:10.1128/AEM.02719-12.
89. Plain K.M., Marsh I.B., Waldron A.M., Galea F., Whittington A.M., Saunders V.F., Begg D.J., de Silva K., Purdie A.C. & Whittington R.J. (2014). – High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **52** (3), 745–757. doi:10.1128/JCM.03233-13.
90. Sevilla I.A., Garrido J.M., Molina E., Geijo M.V., Elguezabal N., Vázquez P. & Juste R.A. (2014). – Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80** (12), 3757–3768. doi:10.1128/AEM.01026-14.

91. Vordermeier M., Whelan A.O. & Hewinson R.G. (2003). – Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infect. Immun.*, **71** (4), 1980–1987. doi:10.1128/IAI.71.4.1980-1987.2003.
92. Ewer K., Cockle P., Gordon S., Mansoor H., Govaerts M., Walravens K., Marché S., Hewinson G. & Vordermeier M. (2006). – Antigen mining with iterative genome screens identifies novel diagnostics for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13** (1), 90–97. doi:10.1128/CVI.13.1.90-97.2006.
93. Jones G.J., Gordon S.V., Hewinson R.G. & Vordermeier H.M. (2010). – Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* reveals the immunodominance of the ESAT-6 protein family. *Infect. Immun.*, **78** (3), 1326–1332. doi:10.1128/IAI.01246-09.
94. Houben E.N., Korotkov K.V. & Bitter W. (2014). – Take five – Type VII secretion systems of mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843** (8), 1707–1716. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.11.003.
95. Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V. & Bannantine J.P. (2004). – Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (6), 2675–2681. ttp://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.6.2675-2681.2004.
96. Bannantine J.P., Hansen J.K., Paustian M.L., Amonsin A., Li L.L., Stabel J.R. & Kapur V. (2004). – Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (1), 106–114. doi:10.1128/JCM.42.1.106-114.2004
-

