

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES**



**Confirmación de la identidad y determinación de la variabilidad genética de aislamientos de *Mycobacterium* sp. obtenidos durante el diagnóstico de tuberculosis bovina por cultivo, en el SENASA durante los años 2018-2021, Costa Rica**

**Eunice Francinie Viquez Ruiz**

**Universidad Nacional, Heredia, setiembre 2025**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría Académica en Epidemiología para optar al grado de *Magister Scientiae***

**Confirmación de la identidad y determinación de la variabilidad genética de  
aislamientos de *Mycobacterium* sp. obtenidos durante el diagnóstico de  
tuberculosis bovina por cultivo, en el SENASA durante los años 2018-2021,  
Costa Rica**

**Eunice Francinie Viquez Ruiz**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado  
Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría Académica en  
Epidemiología para optar al grado de *Magister Scientiae***

## **Miembros del Tribunal Examinador**

[Dr. Randall Gutiérrez Vargas /Dra. Damaris Castro García / M.Sc. Silvia Argüello Vargas/ Dr. José Vega Baudrit /Dr. Greivin Rodríguez Calderón/ Dra. Rocío Castillo Cedeño]

Representante del Consejo Central de Posgrado

Keneth Masis Leandro, M.Sc.

Coordinador del posgrado o su representante

Gabriela Hernández Mora, PhD.

Tutora de tesis

Elías Barquero Calvo, PhD.

Miembro del Comité Asesor

María Jimena Marfil, PhD.

Miembro del Comité Asesor

Eunice Francinie Viquez Ruiz, Lic.

Sustentante

## Resumen general

La tuberculosis bovina, causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, constituye un desafío sanitario, económico y epidemiológico debido a su impacto en los sistemas ganaderos, su carácter zoonótico y las dificultades asociadas con su control. El cultivo bacteriano continúa siendo el estándar de referencia para la confirmación del agente, aunque presenta limitaciones derivadas del tiempo requerido y la variabilidad en la recuperación del agente infeccioso. Este trabajo integra los resultados del cultivo microbiológico, la confirmación molecular y el análisis genómico para caracterizar la estructura poblacional de cepas circulantes de *M. bovis* en Costa Rica para los años 2018-2021.

Se analizaron 337 solicitudes de cultivo que incluían 894 muestras procesadas entre 2018 y 2021 por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), con una positividad en cultivo en medio Stonebrink cercana al 35% y con Alajuela como la provincia con mayor número de aislamientos. Para confirmación del agente, se emplearon dos técnicas moleculares: una PCR múltiple basada en regiones de diferencia para discriminar especies del complejo *M. tuberculosis*, y una qPCR dirigida a los marcadores IS1081 y Locus 3, ambos métodos con alta especificidad y capacidad para confirmar los aislamientos recuperados por cultivo.

Con el fin de profundizar en la diversidad genética de *M. bovis*, se realizó secuenciación del genoma completo (WGS) de 57 aislamientos bovinos y dos de casos humanos. Los resultados evidenciaron la presencia del linaje Europeo 1 según la clasificación clásica de los complejos clonales y se caracterizó la agrupación linaje genético para Costa Rica como Mbovis-07 y sublinaje como Mbovis-07A, revelando una estrecha relación genética entre los aislamientos, con una diversidad intra-linaje inferior a 20 SNP, indicando bajo grado de variación genómica sugiriendo la posible circulación de cepas estrechamente relacionadas.

Además, al realizar el análisis *in silico* de los genomas se logró obtener los patrones de espoligotipos para todos los genomas y al analizar estos se encontró la presencia de cuatro patrones: SB2020, SB1041, SB1040 y un nuevo patrón no registrado previamente, otorgándose el SB2844. El espoligotipo SB2020 fue el predominante, especialmente en Alajuela y San José, lo que sugiere zonas de transmisión sostenida. Herramientas para espoligoforest como MIRU-VNTRplus y MERCAT revelaron una baja variabilidad genética, evidenciando un linaje dominante en el hato bovino costarricense, del cual derivan microvariantes recientes por pérdida progresiva de espaciadores. El patrón SB1040 se ubicó como genotipo más distante y coincidió con un caso humano potencialmente importado.

Los resultados de este trabajo muestran que la integración entre técnicas clásicas y genómicas aporta información clave para la vigilancia epidemiológica, la detección de clústeres de transmisión y la investigación de posibles casos zoonóticos y que es útil combinar el diagnóstico microbiológico y las herramientas moleculares en particular la genómica para complementar el diagnóstico tradicional, apoyar y fortalecer las estrategias de acción y toma de decisiones en el programa nacional para el control y posible erradicación de la tuberculosis bovina en Costa Rica

## Agradecimientos

Agradezco profundamente a todas las personas que formaron parte de este camino de construcción profesional.

A mi tutora la Dra. Gabriela Hernández por creer en mí y darme libertad para todo lo que aplicamos en el laboratorio para apoyar y mejorar el diagnóstico no solo en tuberculosis.

A mis lectores el Dr. Barquero y la Dra. Marfil por su apoyo constante, guía y valioso tiempo en colaboración.

A la UNA, mi alma Máter, por ser la institución que me abrió las puertas laborales en la línea de ejercicio profesional que siempre tuve en dirección: enfermedades, salud pública y animal.

Al MICITT por la oportunidad de beca con el programa PINN. Al posgrado de Ciencias Veterinarias de la UNA por el apoyo y seguimiento constante para concluir de forma exitosa.

Al SENASA por ser mi espacio de desarrollo profesional y darme oportunidades de actualización y capacitación en el ámbito de aplicación laboral y de crecimiento profesional.

Al USDA por el apoyo económico con el proyecto que permitió entre varios alcances, obtener las primeras secuencias de genoma completo de aislamientos de *M. bovis*.

A mis compañeros, colegas y amistades por las horas compartidas, ideas, y apoyo, lo que me recuerda que la ciencia siempre avanza mejor en comunidad.

A mi familia, gracias por acompañarme en cada paso que he dado.

A todas las personas que, de una u otra forma, me acompañaron en este proceso, gracias. Este trabajo es el resultado de todos.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia, cuyo amor y apoyo permanente han sido el fundamento de cada uno de mis logros. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo, la perseverancia y la dedicación, y por acompañarme de manera incondicional a lo largo de este camino.

De manera especial, a mi esposo, por su constante respaldo, por escucharme con paciencia y por impulsarme siempre a alcanzar cada meta que me propongo.

A mis hijos, con la esperanza de que este esfuerzo los motive a alcanzar sus propios logros y puedan sentirse orgullosos de su madre.

## Índice

<b>Resumen general .....</b>	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>v</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción general.....</b>	<b>12</b>
1. Generalidades de <i>Mycobacterium</i> y tuberculosis bovina.....	12
2. Patogénesis, manifestaciones clínicas, transmisión y tratamiento .....	14
3. Técnicas diagnósticas para la tuberculosis bovina.....	16
4. Justificación del estudio.....	22
Referencias .....	23
<b>Artículo 1.....</b>	<b>31</b>
<b>Confirmación molecular y variabilidad genómica de <i>Mycobacterium</i></b>	
<b><i>bovis</i> aislado por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (2018–</b>	
<b>2021) .....</b>	<b>31</b>
Resumen.....	31
Palabras clave.....	32
1. Introducción.....	33
Objetivo .....	35
2. Materiales y Métodos .....	35
Análisis del Cultivo .....	35
Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina .....	36
Determinación de la variabilidad genética .....	38
3. Resultados .....	39
Análisis del Cultivo .....	39
Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina .....	43
Determinación de la variabilidad genética .....	49
4. Discusión.....	51
Análisis del Cultivo .....	51
Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina .....	54
Determinación de la variabilidad genética .....	56

5. Conclusiones.....	58
Referencias .....	59
Material suplementario .....	63
<b>Artículo 2.....</b>	<b>69</b>
<b>Patrones de espoligotipos y relaciones genéticas en aislamientos de <i>Mycobacterium bovis</i> con genoma completo en Costa Rica: implicaciones para la vigilancia epidemiológica .....</b>	<b>69</b>
Resumen .....	69
Abstract .....	70
Palabras clave:.....	71
1. Introducción.....	71
Objetivo .....	72
2. Materiales y Métodos .....	72
3. Resultados .....	75
4. Discusión.....	82
5. Conclusiones.....	86
Referencias .....	87
<b>Discusión general .....</b>	<b>93</b>
Referencias .....	95
<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>98</b>
<b>Recomendaciones generales .....</b>	<b>99</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de las regiones genómicas involucradas en la técnica de espoligotipado para estudio de cepas de *Mycobacterium bovis*. ..... 21

## Índice de cuadros

---

### Artículo 1

Título del cuadro	Página
Cuadro 1. Clasificación porcentual de los resultados las muestras analizadas por cultivo para tuberculosis bovina entre 2018-2021. ....	40
Cuadro 2. Clasificación de las muestras recibidas de acuerdo con el tipo de solicitud (seguimiento de caso, saneamiento, diagnóstico y vigilancia en matadero), con los respectivos resultados positivos y negativos y el porcentaje de positividad para cada grupo. ....	41
Cuadro 3. Distribución geográfica de las muestras con cultivo positivo para tuberculosis bovina por provincia y cantón. ....	42
Cuadro 4. Comparación de los valores observados en la amplificación de las regiones RD1, RD4, RD9 y RD12 para <i>M. bovis</i> , mostrando medidas de dispersión y errores relativos y absolutos en relación con los tamaños esperados de los amplicones. ....	44
Cuadro 5. Datos de concentración de las diluciones de ADN de <i>M. bovis</i> de referencia y valores CT obtenidos en el análisis por PCR a Tiempo Real usando sondas TaqMan L3 y IS 1081. ....	47
Cuadro 6. Valores de Ct detectados de las regiones específicas para <i>M. bovis</i> y para miembros del complejo MTBC; así como la cantidad de ADN por reacción utilizado en este qPCR. ....	48

## Índice de figuras

<b>Artículo 1</b>		
	<b>Título de la figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1.	Representación esquemática de las regiones genómicas involucradas en la técnica de espoligotipado para estudio de cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> . .....	21
Figura 2.	Representación porcentual del resultado del cultivo de tuberculosis bovina, según tipo de solicitud. ....	41
Figura 3.	Procedencia geográfica de fincas bovinas con muestras con resultado de cultivo positivo para tuberculosis bovina en Costa Rica. ....	43
Figura 4.	Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especie de <i>Mycobacterium bovis</i> . ....	44
Figura 5.	Serie de diluciones decimales utilizadas para evaluar sensibilidad analítica de PCR múltiple para la confirmación de <i>M. bovis</i> . ....	45
Figura 6.	Selectividad de la PCR múltiple para la detección específica de <i>M. bovis</i> frente a otras micobacterias. ....	46
Figura 7.	Curva de amplificación por PCR a Tiempo Real basado en diluciones seriadas en base 10 para ADN de referencia de <i>M. bovis</i> usando sondas tipo TaqMan L3 y IS 1081. ....	47
Figura 8.	Ecuación de la recta para un ensayo de curva de amplificación analizado por PCR a Tiempo Real usando sondas TaqMan L3 y IS 1081. ....	48
Figura 9.	Curva de amplificación de <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> y <i>M. bovis</i> para la región L3 y la secuencia de inserción IS 1081. ....	49
Figura 10.	Árbol filogenético de aislamientos de <i>Mycobacterium bovis</i> del linaje Mbovis-07A. Representación filogenética basada en análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) obtenidos a partir de secuenciación de genoma completo de aislamientos procedente de bovinos en Costa Rica, comparados con aislamientos representativos de Guatemala, México y Canadá. ....	51

## Índice de cuadros

---

### Artículo 2

Título del cuadro	Página
Cuadro 1. Caracterización de los aislamientos de <i>Mycobacterium bovis</i> mediante spoligotyping, con detalle del número de aislamientos por patrón SB, el huésped de origen y el tipo de muestra analizada.....	75

## Índice de figuras

---

### Artículo 2

Título de la figura	Página
Figura 1. Patrones de espoligotipos identificados en los aislamientos de <i>Mycobacterium bovis</i> , mostrando la representación gráfica del patrón, su equivalente en código binario, y los códigos octal y hexadecimal asociados. ....	77
Figura 2. Determinación de relaciones genéticas entre espoligotipos de <i>M. bovis</i> con MERCAT Y MIRU-VNTR Plus. ....	77
Figura 3. Análisis de relaciones genéticas entre espoligotipos de <i>Mycobacterium bovis</i> . ....	79
Figura 4. MST espoligotipos de 43 espaciadores.....	82

## Introducción general

### 1. Generalidades de *Mycobacterium* y tuberculosis bovina

El doctor Robert Koch comenzó su investigación sobre el agente causal de la tuberculosis en 1881 al cual llamó Tuberkelbacillen (Tuberkelbacillus); años después, en 1883, el doctor W. Zopf propuso el nombre *Bacterium* o *Bacillus tuberculosis*. Posteriormente, K. Lehmann y R. Neumann en 1896 (Meehan et al., 2021), introdujeron el nombre de género *Mycobacterium*, refiriéndose a la capacidad del bacilo para formar una película en medio líquido, semejante a la de los hongos (Dorronsoro y Torroba, 2007). A partir de ello, se reportaron los microorganismos aislados en humanos y en ganado y se distinguió entre *Mycobacterium tuberculosis hominis* y *Mycobacterium tuberculosis bovis* (Grange, 1982).

El género *Mycobacterium* se ubica como único género dentro de la familia *Mycobacteriaceae*; las cuales, son bacilos aerobios que no forman esporas y su crecimiento ocasionalmente es de tipo filamentoso; además, son bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR's) y una de sus principales características es la morfología de la pared celular, la cual les confiere su alta patogenicidad y resistencia farmacológica (Ortega Hernández, 2019).

La tuberculosis en bovinos y otros rumiantes es una enfermedad infecciosa causada principalmente por el agente bacteriano *Mycobacterium bovis*, que afecta también a otros animales domésticos tales como ovinos, caprinos, porcinos, equinos y aves y ciertas poblaciones de animales silvestres libres o en cautiverio (OIE, 2018).

*Mycobacterium bovis* es bacteria gram positiva y se caracteriza por causar tubérculos (lesiones granulomatosas nodulares) en animales, principalmente del ganado bovino (Cumbicos, 2021; Galvagno et al., 2021; OIE, 2018); es un miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), el cual se compone de un grupo de especies de relacionadas genéticamente en un 99,9%; tales como *M. tuberculosis*, *M. africanum* (ambas infecta a humanos), *M. microti* (infecta ratones y musarañas), *Dassie bacillus*

(damanes), *M. pinnipedii* (focas y leones marinos), *M. caprae* (cabras), *M. bovis* (ganado bovino), *M. orygis* (órices, gacelas, ciervos, antílopes, búfalos y también humanos), *M. mungi* (mangostas) y *M. suricattae* (suricatos) (Bernitz et al., 2021; Comín Polo, 2023); pero difieren entre sí en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente, morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores (Pérez Barragán y Manjarrez Tellez, 2017).

Según Chamizo (2019), la tuberculosis bovina (bTB) es una enfermedad zoonótica, que afecta directamente la eficiencia de los sistemas productivos y de la industria del sector pecuario, provocando importantes pérdidas en la producción de carne y de leche; además, constituye una restricción a la exportación de los alimentos de origen animal, lo que conlleva a importantes pérdidas económicas (Amorim et al., 2022; Berná et al., 2021). Como se indicó anteriormente, por tratarse de una enfermedad zoonótica, Vega et al. (2019), mencionan que el hombre puede adquirir la enfermedad por contacto con animales enfermos, principalmente, en el contexto laboral, o al consumir derivados lácteos no pasteurizados.

Para Garbaccio et al. (2016), la utilización de ensayos diagnósticos confirmatorios, como la bacteriología y la histopatología post mortem presentan gran importancia diagnóstica y ésta última, se considera la técnica de referencia en el diagnóstico de tuberculosis bovina; sin embargo, el tiempo y proceso de descontaminación que se requieren para la obtención de resultados ha llevado a la búsqueda de técnicas tal como la PCR a Tiempo Real; el cual es un método muy preciso, rápido y sensible para la detección de micobacterias, diferenciación de especies, cuantificación de la carga micobacteriana y detección de resistencia a fármacos en la infección por micobacterias; además permite diferenciar entre especies y subespecies, incluso entre cepas de una misma especie (Mantilla et al., 2009; Sidhu et al., 2020; Váradi et al., 2017).

## 2. Patogénesis, manifestaciones clínicas, transmisión y tratamiento

La transmisión y patogenicidad de las diferentes enfermedades ocasionadas por *Mycobacterium* siguen un patrón muy similar entre especies. En bovinos la tuberculosis puede ser causada por *M. bovis* o *M. caprae* (Biet, 2005; Loiseau et al., 2020). La enfermedad se caracteriza por la presencia de tubérculos o lesiones granulomatosas nodulares, que son nódulos inflamatorios amarillentos circunscritos de aproximadamente 2-20 mm de diámetro que están más o menos encapsulados por tejido conectivo y a menudo contienen necrosis caseosa central y mineralización. Las lesiones se encuentran en los linfonodos (LN) particularmente bronquiales, retrofaríngeos, mediastínicos, supramamarios, mandibulares y mesentéricos; también son comunes en pulmón, bazo, hígado, corazón, riñón y superficies de las cavidades corporales (Aboukhassib et al., 2016; Llorente-Real et al., 2019).

La susceptibilidad a la infección se rige en parte por la inmunidad del huésped, la capacidad del individuo de evitar la diseminación o contener al patógeno. Sin embargo, los animales diagnosticados con esta enfermedad muestran signos variables de la patología. Una vez que el agente ingresa al huésped, la infección puede ser subclínica por largos periodos, las lesiones pueden formarse y desarrollarse en formas localizadas o generalizadas y la enfermedad puede afectar muchos órganos (Salguero, 2018); dependiendo de la inmunidad del huésped y si pudo contener o no la enfermedad (probablemente si se detecta en un órgano relacionado a la vía de ingreso); sino, es probable que se disemine a otros órganos por continuidad o vía sanguínea o linfática. La enfermedad sigue un curso crónico con la formación de procesos inflamatorios granulomatosos, caseosos y necrotizantes, afectando el tracto respiratorio (pulmones, linfonodos), llegando a diseminarse por todo el cuerpo en una segunda oleada ante una baja de defesas, incluyendo tracto gastrointestinal y órganos linfoides secundarios.

Generalmente; en bovinos, en estadios avanzados de la enfermedad, hay un periodo bastante largo de letargia, emaciación progresiva, letargia, debilidad, anorexia y fiebre fluctuante de poca intensidad, además de inflamación de LN superficiales, obstrucción

por compresión de vías respiratorias, faringe e intestino, lo que tiene como resultado disnea y timpanismo ruminal, y se ha demostrado que 30% de vacas tuberculosas expulsan *M. bovis* a través del tracto respiratorio (Cumbicos Jiménez, 2021). La afectación pulmonar se caracteriza por tos húmeda crónica, anomalías torácicas, y anomalías a la auscultación se pueden escuchar en etapas avanzadas de la enfermedad; pero cuando hay agrandamiento de los LN junto con una enfermedad respiratoria crónica, puede resultar en mayor sospecha (Borham et al., 2022).

Por otro lado, la vía de excreción y vía de ingreso al tracto respiratorio es considerada la ruta principal de transmisión de *M. bovis* de bovino a bovino; también se pueden infectar las crías por medio del calostro de una hembra infectada y por heces contaminadas. La transmisión y patogenicidad de las diferentes enfermedades ocasionadas por *Mycobacterium* siguen un patrón muy similar entre especies (Ortega Espinoza, 2019; Menzies, 2000).

En el caso de *M. bovis* que es zoonótico, el ganado es la principal fuente de infección para los seres humanos. En los seres humanos, esta enfermedad se considera una enfermedad subestimada y desatendida a nivel mundial, que necesita ser reevaluada, especialmente en áreas donde es endémica y donde las personas están en contacto con animales infectados o productos de estos, mediante el consumo de leche no pasteurizada o manejo de carne contaminada (Pérez y Tellez, 2017). Esta es la principal vía de contagio para humanos, por lo cual, casi siempre es extra-pulmonar; mientras que para las personas que se contagian por vía aerógena (los trabajadores, por ejemplo), la vía de entrada puede ser respiratoria.

En seres humanos, la infección primaria por *M. bovis* puede producirse por inhalación, muchas veces asociado a lugares de trabajo u ocupación; lo cual, produce infección primaria en el pulmón y posteriores cuadros gripales, al igual que en los producidos por *M. tuberculosis*, con mayor posibilidad de reactivación en el tracto respiratorio y, eventualmente, diseminación a órganos distantes; en algunos países, donde culturalmente se consumen productos lácteos sin pasteurizar también se puede adquirir la enfermedad, además del contacto cercano con el ganado infectado, lo cual

produce linfadenopatía predominantemente cervical, lesiones intestinales o cutáneas en la infección primaria (Pérez y Tellez, 2017; Vayr et al., 2018).

La tuberculosis bovina representa un problema para la salud humana y animal y es de declaración obligatoria ante la Organización Mundial de Salud Animal (WOAH por sus siglas en inglés). En humanos también representa un desafío en el paciente debido a la resistencia natural a la pirazinamida, uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento; esta, muchas veces es la manera en la que se llega a sospechar o diagnosticar TB zoonótica en las personas, ya que el tratamiento inicial no tiene el efecto deseado (Loiseau, et al., 2020). Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido lograr un mundo libre de tuberculosis para el 2035, meta ambiciosa por lo que hace un llamado a los países miembros a actuar (Olea-Popelka, 2017).

La erradicación es difícil por la complejidad epidemiológica, pues en muchos países involucra reservorios de vida libre (Byrne et al., 2019). No existe un tratamiento para hatos infectados, siendo el mecanismo de control la eliminación de animales reactivos a las pruebas de tuberculina en campo (Loiseau, et al., 2020). A nivel productivo representa una disminución hasta de un 6% en la fertilidad y producción de leche y hasta un 15% del peso promedio del animal, disminuyendo la producción de carne (Magnano et al., 2016).

La investigación y la identificación de *M. bovis* son fundamentales para determinar el impacto de la transmisión zoonótica de la tuberculosis a los seres humanos, ya que impulsa la adopción de medidas de salud pública como la pasteurización de la leche, la cocción adecuada de la carne y el control de la tuberculosis en los animales domésticos (Koro et al., 2015).

### **3. Técnicas diagnósticas para la tuberculosis bovina**

El diagnóstico de tuberculosis bovina no es suficiente con evaluar los signos que presenta el animal; ya que, según Cumbicos Jiménez (2021), estos signos pueden

tardar meses en ser específicos, y el animal debe presentar un estado de inmunodepresión, periodo de estrés o envejecimiento, para que se reactive la enfermedad. Su diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos, en los que están los métodos clínicos, inmunológicos, post mortem, histopatológicos, bacteriológicos y moleculares. Es común que la mayoría de los laboratorios hoy en día utilicen técnicas microbiológicas, ya que se consideran como el método de referencia o estándar para la confirmación de la enfermedad. En el caso del uso de los medios de cultivo es importante considerar ciertos factores para el crecimiento adecuado del microorganismo; tales como el ambiente y nutrientes necesarios para que se lleve a cabo la proliferación de los mismos; sin embargo, cabe mencionar que la identificación del patógeno; en este caso, requiere de personal altamente capacitado en el área (Power y Johnson, 2009). Debido a lo anterior, en los últimos años el interés científico por la tuberculosis ha llevado a desarrollar y mejorar métodos de diagnóstico, prevención, control y erradicación (Ramos, 2015).

Por su parte, el diagnóstico inmunológico ante-mortem se basa en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) in vivo o conocidas como de inmunidad celular, representada por la prueba cutánea de la tuberculina (TST). Este es un método indirecto y puede revelar infecciones incipientes, de tres a ocho semanas después del contacto con *M. bovis*, las ventajas del uso de esta técnica son los bajos costos, la alta disponibilidad, y la larga historia de uso. No obstante, se mencionan limitaciones como la dificultad en la administración y la interpretación de los resultados, la necesidad de una segunda visita, el bajo grado de estandarización y la precisión imperfecta de la prueba (Schiller et al., 2010).

Además de la prueba de tuberculina cutánea, existe una prueba que también se basa en el principio de detección de la respuesta inmunitaria temprana mediada por células en la infección tuberculosa, la prueba de liberación de interferón gamma, que es realizada in vitro. Esta última se está incorporando a programas de erradicación en muchos países ya sea en un régimen de pruebas en serie como prueba de confirmación

después de la prueba del pliegue caudal para mejorar la especificidad o en un régimen de prueba paralelo para mejorar la sensibilidad (Praud et al., 2019).

Sin embargo, considerando animales en etapas avanzadas de la enfermedad, la respuesta inmunitaria mediada por células puede disminuir en lugar de una respuesta inmunitaria humoral generalmente creciente y, por lo tanto, estas pruebas pueden dar resultados falsos negativos. Por otro lado, en el caso del uso de pruebas serológicas tipo ELISA, existen problemas debido a las respuestas de anticuerpos altamente variables observadas entre individuos a antígenos micobacterianos y la variación antigénica entre cepas micobacterianas (Ramos, 2015). cada prueba se puede usar con cierta efectividad en diferentes etapas; para que la respuesta humoral sea medible, en general la enfermedad está muy avanzada y diseminada, y hubo un cambio de la respuesta inmunitaria, dejando de reaccionar de forma celular (los LT sensibilizados que monitoreaban) a pasar a formar anticuerpos. Es por esto que la técnica ELISA no es tan efectiva para detección temprana, porque el estadio tiene que estar muy avanzado; en cambio si sirve para detectar anérgicos a las pruebas celulares, como son TST e IGRA, que miden lo mismo pero una in vivo y la otra in vitro.

El diagnóstico post-mortem; tanto en la revisión habitual para consumo, como para la detección de TB, depende de la inspección visual adecuada, la palpación y; en el caso de procedimientos de diagnóstico posteriores, como aislamiento bacteriano, histopatología característica y PCR para llegar al diagnóstico final de TB (Borham et al., 2022). El examen post-mortem es indispensable para los programas de control epidemiológico en áreas endémicas, para detectar las lesiones compatibles con TB en frigoríficos/mataderos durante la inspección rutinaria o en animales con diagnóstico presuntivo por TST o IGRA (De la Cruz et al., 2018).

Para el diagnóstico definitivo se requiere el cultivo bacteriano para aislar el agente; el cual es considerado el "estándar de oro", seguido de la identificación molecular. Sin embargo, el largo período requerido, es uno de sus puntos críticos, pues se necesita de seis hasta doce semanas para completar el diagnóstico final. Las muestras recolectadas de tejidos son expuestas a métodos de descontaminación que involucran

la adición de NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ácido oxálico o compuestos de amonio cuaternario para eliminar microorganismos competitivos. Desafortunadamente, los efectos tóxicos pueden afectar la viabilidad de las micobacterias, interfiriendo con el éxito del cultivo. Este hecho se evidencia con la sensibilidad reportada del medio de cultivo de elección (medio Stonebrink) que alcanza un 43%, lo cual limita significativamente la confirmación de los casos utilizando esta metodología (Corner et al., 2012; Medeiros et al., 2010).

Al igual que en otros métodos bacteriológicos, la calidad de la muestra es crítica para la recuperación de esta bacteria y mejorar el método microbiológico convencional (Ramos, 2015). Los patrones de crecimiento característicos y la morfología colonial pueden proporcionar un diagnóstico presuntivo de *M. bovis*; sin embargo, se requiere confirmación por métodos más sensibles, precisos y rápidos, como los métodos moleculares. En ese sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha aplicado con éxito para detectar miembros del MTBC y específicamente de *M. bovis*, ya sea de aislamientos o directamente de tejido, sin embargo, en los ensayos moleculares es necesaria la estandarización previa (Amorim et al., 2022; González Díaz, 2016).

Con el tiempo se han propuesto distintos métodos de PCR para analizar muestras de tejido, leche, tejidos fijados en formalina o parafina. Estos han sido diseñados con distintos blancos genómicos como secuencias rRNA 16S-23S, las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, así como genes que codifican proteínas (Lorente-Leal et al., 2019; Goosen et al., 2020). La implementación de técnicas como la PCR, disminuye los tiempos de respuesta, presenta mejor precisión, reproducibilidad y permite el análisis de un gran número de muestras, y de diferentes matrices, agilizando el diagnóstico (Amorim et al., 2022; González Díaz, 2016).

Sin embargo, estos métodos presentan ciertas limitantes; como, por ejemplo, no permite ver viabilidad de la bacteria, la extracción de ADN genómico de calidad amplificable, la disponibilidad de oligonucleótidos con alta precisión y la contaminación cruzada; los cuales son factores importantes a tomar en cuenta para la estandarización

de métodos moleculares. La variación en los resultados de los autores en cuanto a la especificidad y sensibilidad de estas pruebas, se debe a muchos factores como el tipo de muestra, preparación de la muestra, sistema de amplificación y detección del producto amplificado, siendo necesario protocolos confiables y estandarizados por los laboratorios (Ramos, 2015).

Para el caso de *M. bovis*, existe dificultad en la caracterización de aislamientos por lo altamente conservado que es su genoma, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas de biología molecular como identificación de elementos de inserción IS1081 y IS6110 en el caso del MTBC, microsatélites variables o MIRU-VNTR, presencia o ausencia de unidades espaciadoras cortas encontradas en región de repetición directa (DR) del cromosoma (conocidas como perfiles de espoligotipos), entre otros (Smith y Upton, 2012).

Es por esto que se sugiere el genotipado por espoligotipos, el cual, puede ser aplicado gracias a que los organismos miembros del MTBC tienen un sistema de defensa contra ácidos nucleicos invasores conocido como CRISPR/Cas de Tipo III A; esta secuencia se llama como DR locus y contiene el elemento IS6110 con muchas repeticiones directas (DR) de 36 pb intercaladas por secuencias espaciadoras que oscilan entre 35 y 41 pb. Una DR y su secuencia espaciadora vecina se conoce como DVR. El orden de los espaciadores es similar entre las cepas de MTBC, pero los DVR se pueden eliminar. Por tanto, la diferencia entre dos aislamientos viene dada por la presencia variable de espaciadores en la región DR. Solo hay un locus DR por genoma de MTBC y hasta 43 espaciadores únicos entre DR (figura 1). La metodología para obtener los espoligotipos puede ser mediante la hibridación de ADN espaciador amplificado por PCR con un conjunto de oligonucleótidos inmovilizados en una membrana de nitrocelulosa o partir de secuencia de genoma completo por análisis bioinformático (Guimaraes y Zimpel, 2020; Kamerbeek et al., 1997).

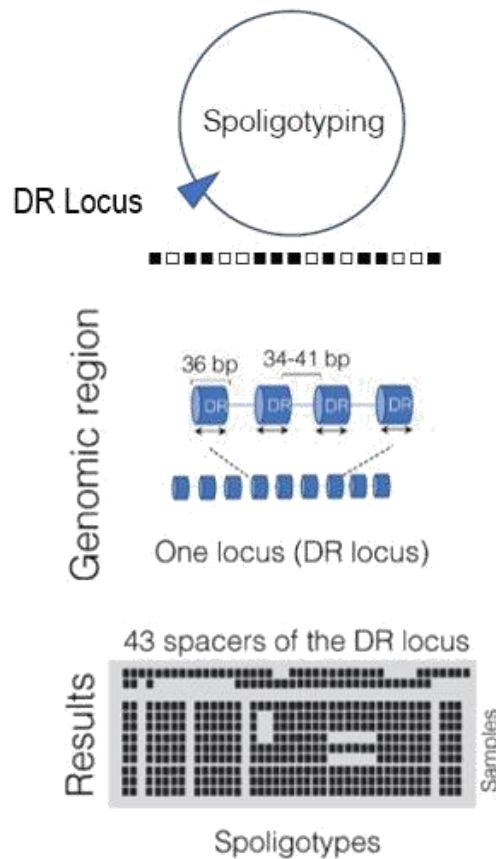


Figura 1. Representación esquemática de las regiones genómicas involucradas en la técnica de espiligotipado para estudio de cepas de *Mycobacterium bovis*. Tomado y modificado de Guimaraes y Zimpel (2020).

Los métodos de MIRU-VNTR y espiligotipos son de los más utilizados en el genotipado de *M. bovis* para la vigilancia epidemiológica. Cada técnica o una combinación de las mismas presenta un poder de resolución distinto a nivel de país, región, subregión e incluso finca (Guimaraes y Zimpel, 2020; Tuzcu y Köksal, 2020).

Más recientemente, uno de los avances clave para la comprensión de *M. bovis* ha sido la elucidación de la secuencia completa del genoma. La disponibilidad de la secuencia del genoma permite realizar análisis comparativos que brindan información importante y clave entre el bacilo humano y bovino, investigación de transmisión, vigilancia, distribución de linajes globales, multiresistencia, virulencia, entre otros. La secuenciación y la bioinformática han ganado cada vez más importancia para el diagnóstico incluyendo tipificación, detección de mutaciones, análisis filogenético,

epidemiología molecular, entre otros (Borham et al., 2022; Guimaraes y Zimpel, 2020; Tazerart et al., 2021).

#### **4. Justificación del estudio**

La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica de declaración obligatoria ante la OIA. Sigue siendo un problema económico importante y de salud pública en América Latina. Reconociendo la importancia, existe una meta de la OMS en lograr un mundo libre de tuberculosis para el 2035, meta ambiciosa por lo que se hace un llamado a los países miembros a actuar (Olea-Popelka, 2017).

En 1977, Costa Rica inició el Programa Nacional de Tuberculosis Bovina como parte del Programa Nacional de Salud Animal (PRONASA) que junto al Programa Nacional de Brucelosis Bovina dieron inicio al nacimiento de la atención de la Salud Animal. A través de estos años el Servicio de Salud Animal (SENASA), del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), ha desarrollado actividades de diagnóstico para la atención de esta enfermedad, abordando de forma conjunta la detección y saneamiento de fincas (SENASA, 2021). Así, para el año 2008 entró a regir el Decreto Ejecutivo N° 34852-MAG denominado “Reglamento para la prevención, el control, y la erradicación de la Tuberculosis en Bovinos” (La Gaceta, 2008), bajo normativa, protocolos específicos y fiscalización del SENASA y diez años después, en el 2018 se firma la reforma del artículo primero mediante el cual se declara combate oficial para reforzar las medidas de control, disminuir prevalencia y lograr erradicación. Actualmente no se tiene un dato cierto de la prevalencia de la enfermedad, pero se conoce que es endémica y que ha ocurrido zoonosis, lo que hace importante su abordaje desde el concepto de “Una Salud”.

Por otro lado, en cuanto al diagnóstico de la tuberculosis bovina, las técnicas más utilizadas para diagnosticar la enfermedad son el aislamiento bacteriano en medios de cultivo líquido (BACTEC MGIT) y sólido (Stonebrink y Middlebrook 7H11P, principalmente), con subsecuente identificación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. A la fecha, no existe un estudio que haya

analizado los resultados obtenidos de cultivo de *Mycobacterium bovis* por el Servicio Nacional de Salud Animal de Costa Rica (SENASA) durante los últimos años, ni la variabilidad genética de las cepas aisladas.

Cuando se obtienen cultivos positivos, existe además la necesidad de confirmar los aislamientos de *Mycobacterium*, específicamente si se trata de *M. bovis*., mediante metodologías más exactas, específicas y rápidas como la PCR; que, a diferencia de las pruebas bioquímicas, permite agilizar el diagnóstico al disminuir los tiempos para la obtención de resultados del análisis.

También, es importante realizar el monitoreo genético de los aislamientos encontrados para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad; y con esto, nace la necesidad de utilizar herramientas avanzadas como la secuenciación de genoma completo y análisis bioinformáticos posteriores que permiten genotipificar cepas del MTBC.

En ese contexto, con el presente trabajo se analizarán los aislamientos de *Mycobacterium bovis* obtenidos en Costa Rica durante el periodo 2018–2021 mediante cultivo y herramientas moleculares; para confirmar su identidad genética, determinar su variabilidad, patrones de espoligotipos y relaciones genéticas, con el fin de fortalecer la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina.

## Referencias

Aboukhassib, H., Haraji, M., Bouslikhane, M. y Bitar, A. (2016). Bovine tuberculosis: Clinical presentation and diagnosis. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, 3(2): 00057. <https://doi:10.15406/jbmoa.2016.03.00057>

Amorim, J. Q., Santos, B. R., Fehlberh, H. F., Silva, A. V., Ferreira, F. F., Costa, J. N. y Alzamora Filho, F. (2022). Isolation and molecular identification of *Mycobacterium bovis* in tissue lesions of cattle slaughtered in slaughterhouses located in the State of Ceará. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 74(2):338-344. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12394>

Berná, L., Castro Ramos, M. A., Fresia Coronel, P., Robello Porto, C., Salaberry, X., Suanes Martínez, A. y Carrasco Muñoz, V. (2021). Informe final publicable del proyecto Generación de un banco de cepas y ADN estandarizado para estudios epidemiológicos de *Mycobacterium bovis* en Uruguay. [https://redi.anii.org.uy/jspui/bitstream/20.500.12381/553/1/Informe\\_final\\_publicable\\_FMV\\_3\\_2018\\_1\\_148718.pdf](https://redi.anii.org.uy/jspui/bitstream/20.500.12381/553/1/Informe_final_publicable_FMV_3_2018_1_148718.pdf)

Bernitz, N., Kerr, T. J., Goosen, W. J., Chileshe, J., Higgitt, R. L., Roos, E. O. y Miller, M. A. (2021). Review of Diagnostic Tests for Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in South African Wildlife. *Front. Vet. Sci.*, 8 :588697. [https://doi:10.3389/fvets.2021.588697](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.588697)

Biet, F., Boschioli, M. L., Thorel, M. F. y Guilloteau, L. A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary research*, 36(3):411-436. [https://doi:10.1051/vetres:2005001](https://doi.org/10.1051/vetres:2005001)

Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M., y Matsumoto, T. (2022). Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant *Mycobacterium* Species. *Pathogens*, 11(7): 715.<https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>

Byrne, A. W., Allen, A., O'Brien, D. J. y Miller, M. A. (2019). Bovine tuberculosis—international perspectives on epidemiology and management. *Frontiers in veterinary science*, 6:202. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00202>

Chamizo-Pestana, E. G. (2019). Tuberculosis bovina. *Revista Ciencia Universitaria*, 17(2): ISBN:978-959-16-4290-5. <https://rcta.unah.edu.cu/index.php/ACUNAH/article/view/1594>

Comín Polo, J. (2023). Caracterización molecular con técnicas de secuenciación masiva para el estudio de transmisión y evolución de *Mycobacterium tuberculosis* complex en Aragón [Tesis de posgrado, Universidad de Zaragoza, España]. <https://zaguan.unizar.es/collection/tesis>

Corner, L. A. L., Gormley, E. y Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary microbiology*, 156(1-2):162-171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

Cumbicos Jiménez, J. E. (2021). Análisis Documental de la prevalencia de *Mycobacterium bovis* mediante prueba de tuberculina [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador]. <https://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10316>

Dorronsoró, I. y Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar*, 30(2): 67-84. <https://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf>

De la Cruz, M. L., Branscum, A. J., Nacar, J., Pages, E., Pozo, P., Perez, A., Grau, A., Saez, J. L., de Juan, L., Diaz, R., Minguez, O. y Alvarez, J. (2018). Evaluation of the performance of the IDvet IFN-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis in Spain. *Front Vet Sci*, 5:229. <https://doi:10.3389/fvets.2018.00229>

Garbaccio, S., Barandiaran, S., Fernández, A., Macias, A., Magnano, G., Martinez, M., Peyrú, M. y Cataldi, A. (2016). Ensayo interlaboratorio: aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de lesiones granulomatosas en bovinos. *Rev Argent Microbiol.*, 48(2):161-165. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.03.004>

Galvagno, M. I., Donato, M. L., Buscio, M., Aguirre, J., Pérez, G., Ceballo, V. y Arpí, L. (2021). Infección por *Mycobacterium bovis* en una adolescente con síndrome febril prolongado. *Arch Argent Pediatr*, 119(5): e522-e525. <https://doi.org/10.5546/aap.2021.e522>

Goosen, W. J., Kerr, T. J., Kleynhans, L., Buss, P. E., Cooper, D. V. y Warren, R. M. (2020). The VetMAX™ M. tuberculosis complex PCR kit detects MTBC DNA in antemortem and postmortem samples from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*), African elephants (*Loxodonta africana*) and African buffaloes (*Syncerus caffer*). *BMC Vet Res*, 16:220. <https://doi:10.1186/s12917-020-02438-9>

González Díaz, R. J. (2016). Tuberculosis bovina: implementación del diagnóstico molecular y concordancia con técnicas diagnósticas utilizadas en Costa Rica. [Tesis de posgrado, Universidad Nacional, Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/21867>

Grange, J. M. El bacilo tuberculoso de Koch - una revaloración centenaria. (1982). *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A Medizinische Mikrobiologie Infektionskrankheiten Parasitologie*, 251(3):297-307. PMID: 6805153.

Guimaraes, A. M. y Zimpel, C. K. (2020). *Mycobacterium bovis*: from genotyping to genome sequencing. *Microorganisms*, 8(5):667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. y van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>

Koro, F., Ngatchou, A. F., Portal, J. L., Gutierrez, C., Etoa, F. X. y Eyangoh, S. I. (2015). The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(3) :1001-1010. <https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2390>

La Gaceta. (2018). Decreto Ejecutivo N° 34852-MAG denominado “Reglamento para la prevención, el control, y la erradicación de la Tuberculosis en Bovinos”. Recuperado de: Sistema Costarricense de Información Jurídica. <https://www.pgrweb.go.cr>

Llorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Benzos, J., Dominguez, L., de Juan, L. y Romero, B. (2019). Validation of a Real-Time PCR for the detection of *Mycobacterium Tuberculosis Complex* members in bovine tissue samples. *Front. Vet. Sci.*, 6(61). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>

Loiseau, Ch., Menardo, F., Aseffa, A., Hailu, E., Gumi, B., Ameni, G. y Brites, D. (2020). An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 49–59. <https://doi:10.1093/emph/eoaa005>

Mantilla, G. J., Ortiz, M. M., Acosta, A. M., Acosta, G. R. y Sousa, Z. J. (2009). Diagnóstico de tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina. *MV Rev. de Cien. Vet*, 25(1):7-9. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/Diagnostico-de-tuberculosis-bovina-por-aislamiento-bacteriologico-o-histopatologico-de-vacunos-reactivos-a-la-prueba-de-tuberculina.pdf>

Medeiros, L. d. S., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E. y Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3):531-541. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000002>

Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y. E., Cogneau, S. y Rigouts, L. (2021). Reconstituyendo el género *Mycobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 71(9):004922. <https://doi:10.1099/ijsem.0.004922>.

Menzies, F. D. y Neill, S. D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160(2):92-106. <https://doi:10.1053/tvjl.2000.0482>

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Manual terrestre de la OIE. Tuberculosis bovina (Capítulo 3.4.6). <https://www.woah.org/es/enfermedad/tuberculosis-bovina/>

Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A. S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B. J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBlue, F. y Fujiwara, P. (2017). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* a call for action. *The Lancet Infectious Diseases*. 17(1): e21- e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)

Ortega Hernández, C. I. (2019). Valoración del cultivo líquido ligado a PCR Tiempo Real para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de la tuberculosis bovina. [Tesis de posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/19992>

Praud, A., Bourély, C., Boschioli, M. L. y Dufour, B. (2019). Assessment of the specificity of a gamma-interferon test performed with specific antigens to detect bovine tuberculosis, after non-negative results to intradermal tuberculin testing. *Veterinary Record Open*, 6(1): e000335. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2019-000335>

Pérez-Barragán, E. y B, Manjarrez-Tellez. (2017). Tuberculosis por *Mycobacterium bovis*: ¿una infección reemergente? *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 55(5):635-40. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=85492>

Power, D. A. y Johnson, J. A. (2009). Difco™ & BBL™ manual. Manual of Microbiological Culture Media, 359, 60. [https://difcoblmanual\\_2nded20190902-99719-1iju1s9-libre.pdf](https://difcoblmanual_2nded20190902-99719-1iju1s9-libre.pdf)

Ramos, D. F., Silva, P. E. A. y Dellagostin, O. A. (2015). Diagnóstico de tuberculose bovina: revisão das principais técnicas. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4):830-837. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.23613>

Salguero, F. J. (2018). The pathology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. In *Bovine tuberculosis* (pp. 122-139). Wallingford UK: CAB International.

Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M.V., Harris, B. N., Orloski, K. A., Buddle, B. M., Thacker, T. C., Lyashchenko, K. P. y Waters, W. R. (2010). Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(4):205-220. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>

SENASA. (2021). Protocolo de vigilancia y control de tuberculosis. <http://www.senasa.go.cr/informacion/centrodeinformacion/informacion/sgc/pnt/526web/file>

Sidhu, G. S., Narang, D., Folia, G., Singh, A., Singh, S. T., Chandra, M. y Sharma, N. S. (2020). Real-Time PCR Detection of *Mycobacterium bovis* in Blood and Lymph Node Aspirates of Bovines Positive in Tuberculosis Screening Tests. *Indian Journal of Animal Research*, 54(10):1241-1245. <https://doi:10.18805/ijar.B-3573>

Smith, N. H. y Upton, P. (2012). Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www. Mbovis. org. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4):873-876. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.002>

Tazerart, F., Saad, J., Sahraoui, N., Yala, D., Niar, A. y Drancourt, M. (2021). Whole Genome Sequence Analysis of *Mycobacterium bovis* Cattle Isolates, Algeria. *Pathogens*, 10(7) :802. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070802>

Tuzcu, N. y Köksal, F. (2020). Genetic evaluation of *Mycobacterium bovis* isolates with MIRU-VNTR and spoligotyping. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(8):2017-2023. <https://doi.org/10.3906/sag-1910-138>

Vega, M., Sosaa, L., González, M., y Izaguirreb, M. (2019). Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en un niño de la Comuna N° 8, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Arch Argent Pediatr*, 117(5), e532-e535. <https://doi.org/10.5546/aap.2019.e532>

Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenga, S. y Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4818–4832. <https://doi.org/10.1039/c6cs00693k>

Vayr, F., Martin-Blondel, G., Savall, F., Soulat, J. M., Deffontaines, G. y Herin, F. (2018). Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic

review. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(1): e0006208. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006208>

Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M. y Van Helden, P. D. (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(7), 818-2. <https://www.researchgate.net>

## **Artículo 1**

### **Confirmación molecular y variabilidad genómica de *Mycobacterium bovis* aislado por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (2018–2021)**

### **Molecular confirmation and genomic variability of *Mycobacterium bovis* isolated by the National Veterinary Services Laboratory (2018-2021)**

#### **Resumen**

La tuberculosis animal, causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, constituye un reto importante para la salud animal debido a su compleja epidemiología y a las limitaciones de las herramientas diagnósticas tradicionales. El cultivo microbiológico continúa siendo el estándar de oro para confirmar la infección, aunque requiere tiempos prolongados y presenta variabilidad en la recuperación de aislamientos. Su valor radica en permitir la verificación bacteriológica y la obtención de material genético para estudios posteriores. Antes de la secuenciación de genoma completo (WGS), la caracterización molecular de *M. bovis* se basaba en la detección de regiones de diferencia, SNPs y espigotipado. Estos métodos han permitido reconocer infecciones mixtas, policlonales o compartimentalizadas, desafiando la idea de que cada caso corresponde a una sola cepa.

Con el avance de WGS, se ha mejorado la resolución para estudios epidemiológicos y de vigilancia, facilitando el análisis de la diversidad y evolución del patógeno. El genoma de *M. bovis* presenta gran similitud con *M. tuberculosis*, diferenciándose por deleciones que afectan genes relacionados con virulencia y tropismo. A nivel global se reconocen cuatro complejos clonales principales.

El estudio realizado en Costa Rica entre 2018 y 2021 analizó resultados de cultivo, confirmó molecularmente los aislamientos y evaluó su variabilidad genética. Se optimizaron dos PCR-una múltiple y otra en tiempo real-para la identificación específica de *M. bovis*, demostrando buena sensibilidad y especificidad. Finalmente,

se efectuó la secuenciación de cepas seleccionadas mediante la plataforma MiSeq e interpretadas con el pipeline vSNP, lo que permitió establecer relaciones filogenéticas y aportar evidencia útil para fortalecer la vigilancia epidemiológica del país.

## **Abstract**

Animal tuberculosis, primarily caused by *Mycobacterium bovis*, poses a significant challenge to animal health due to its complex epidemiology and the limitations of traditional diagnostic tools. Microbiological culture remains the gold standard for confirming infection, although it is time-consuming and exhibits variability in isolate recovery. Its value lies in enabling bacteriological verification and the collection of genetic material for subsequent studies. Before whole-genome sequencing (WGS), molecular characterization of *M. bovis* relied on the detection of regions of difference (RD), SNPs, and spoligotyping. These methods have allowed for the recognition of mixed, polyclonal, or compartmentalized infections, challenging the notion that each case corresponds to a single strain.

With the advancement of WGS, resolution for epidemiological and surveillance studies has improved, facilitating the analysis of the pathogen's diversity and evolution. The *M. bovis* genome is highly similar to that of *M. tuberculosis*, differing only in deletions that affect genes related to virulence and tropism. Globally, four main clonal complexes are recognized.

The study conducted in Costa Rica between 2018 and 2021 analyzed culture results, molecularly confirmed the isolates, and evaluated their genetic variability. Two PCR assays (one multiplex and one real-time) were optimized for the specific identification of *M. bovis*, demonstrating good sensitivity and specificity. Finally, selected strains were sequenced using the MiSeq platform and interpreted with the vSNP pipeline, allowing for the establishment of phylogenetic relationships and providing useful evidence to strengthen the country's epidemiological surveillance.

## **Palabras clave**

Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, Cultivo bacteriano, Secuenciación de genoma completo, Vigilancia epidemiológica

## 1. Introducción

La tuberculosis animal es una de las enfermedades más relevantes que afectan tanto a la vida silvestre como al ganado a nivel mundial, en gran medida debido a la complejidad de su epidemiología y a las dificultades asociadas con su control. En el ganado bovino, el principal agente asociado a esta enfermedad es *Mycobacterium bovis* (Gomez-Buendia et al., 2021). La confirmación de *Mycobacterium bovis* mediante cultivo microbiológico continúa considerándose el “estándar de oro” para el diagnóstico de tuberculosis bovina, a pesar de sus limitaciones relacionadas con el tiempo necesario para obtener resultados. Esta técnica ofrece una sensibilidad superior a la microscopia directa, lo que permite recuperar aislamientos viables para su posterior análisis. Cada cultivo positivo debe verificarse mediante baciloscopía utilizando la tinción de Ziehl–Neelsen, que confirma la presencia de BAAR, lo cual es sugestivo de micobacterias, por eso se continua el diagnostico

Con el fin de diferenciar especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), particularmente para identificar de manera precisa a *M. bovis* frente a otras micobacterias del grupo (Villavicencio Villavicencio y Luna Herrera, 2021), hoy día se cuenta con nuevas técnicas moleculares.

Antes de la disponibilidad masiva de secuenciación de genoma completo (WGS), la identificación y clasificación genética de *M. bovis* se basaba en la identificación Regiones de Diferencia Cromosómica (RDs) de complejos clonales (CCs), definidos mediante deleciones específicas, además de SNPs y patrones de espoligotipado por técnicas diversas de biología molecular como PCR y sus variantes (Zimpel et al., 2020).

Si bien las herramientas de tipificación genética surgieron originalmente para estudios epidemiológicos, estas han permitido identificar infecciones clonales complejas causadas tanto por *Mycobacterium tuberculosis* como por *M. bovis*, desafiando la noción de que cada episodio de tuberculosis corresponde a una sola cepa. Se han documentado coinfecciones por varias cepas (infección mixta), la presencia

simultánea de variantes clonales (infección policlonal) y distribución heterogénea de variantes en distintos tejidos afectados (infección compartimentalizada) (Navarro García, 2016).

En los últimos años, la secuenciación del genoma completo (WGS) se ha consolidado como una herramienta de alta resolución para la caracterización molecular de la tuberculosis animal, permitiendo evaluar la diversidad y evolución de *M. bovis* y facilitando investigaciones epidemiológicas y de brotes en distintos países (Lorente-Leal et al., 2025).

Por su parte, el genoma de *M. bovis*, de 4.345.492 pares de bases en un cromosoma circular con un contenido de G+C de 65,63 %, incluye 3.952 genes, un profago y 42 secuencias de inserción. Su similitud con el genoma de *M. tuberculosis* supera el 99,95 %, sin grandes reordenamientos, y las diferencias se concentran en genes que codifican proteínas de la pared celular y proteínas secretoras relacionadas con virulencia, adhesión, modulación inmunológica y tropismo tisular. Su evolución está marcada por deleciones genéticas unidireccionales, responsables de su reducción respecto a *M. tuberculosis* (Souza Filho, 2019). Hasta la fecha existen cuatro complejos clonales principales aceptados: Africano 1 y 2, y Europeos 1 y 2 (Zimpel et al., 2020).

Bajo esta perspectiva, la caracterización molecular de *M. bovis* se ha convertido en una práctica necesaria para la vigilancia en muchos países, empleando principalmente técnicas como el espigotipado y, cada vez con mayor frecuencia, la secuenciación del genoma completo (WGS), con el fin de identificar fuentes de infección y apoyar las estrategias de control; ya que la técnica revela posibles vínculos entre animales enfermos, detectando brotes, y aún permite una mayor comprensión de la evolución y la estructura poblacional de *M. bovis* (Gomez-Buendia et al., 2021; Santos et al., 2021).

## **Objetivo**

Analizar los resultados de cultivo de *Mycobacterium bovis* para el diagnóstico de tuberculosis bovina en Costa Rica durante el periodo 2018–2021, confirmar la identidad genética de los aislamientos y determinar su variabilidad mediante herramientas moleculares, con el fin de contribuir a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

## **2. Materiales y Métodos**

### **Análisis del Cultivo**

Para el análisis de los resultados de cultivo bacteriano correspondientes al diagnóstico de tuberculosis bovina durante el período 2018-2021, se construyó una base de datos en Microsoft Excel a partir de la información registrada en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) y de los registros internos del Área de Bacteriología del SENASA.

Se recopilaron datos como: número de protocolo de SENASA (identificación de la solicitud), cantidad de muestras remitidas por solicitud, tipo de muestra, resultado de cultivo, número de muestras positivas por protocolo, y registro de la finca de procedencia (incluyendo ubicación geográfica por provincia, cantón, distrito, latitud y longitud). Además, se consideró el origen de la muestra, diferenciando entre casos provenientes de mataderos y casos con orden sanitaria por diagnóstico previo.

Se realizó un análisis descriptivo de los datos en Excel, y la representación geográfica de las solicitudes y casos positivos se efectuó mediante el software QGIS versión 3.28.13, utilizando la capa de cantones de Costa Rica del Atlas 2014 del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

## **Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina**

Para la confirmación molecular del agente causal de la tuberculosis bovina se optimizaron dos técnicas de PCR, la primera una PCR múltiple tiempo final utilizando el diseño propuesto de Warren et al. (2006), basado en la presencia o ausencia de Regiones de Diferencia Cromosómica (RD) de las micobacterias dentro del Complejo causantes de tuberculosis (MTBC) y la segunda una PCR a Tiempo Real con sonda de fluorescencia específica para la detección de *M. bovis*.

### **PCR múltiple en tiempo final**

Este diseño de PCR fue adaptado para el objetivo de confirmación de *M. bovis* según las condiciones disponibles en el laboratorio (reactivos y equipos). Además de asegurar el buen funcionamiento de esta técnica con resultados conformes según reactivos y material de referencia disponible, se evaluó la sensibilidad analítica (límite de detección) con diluciones en base 10 del ADN de referencia hasta encontrar el menor rango de concentración de material genético en que es posible una detección positiva del agente infeccioso; y la especificidad en la identificación genética de especie de micobacteria usando material genético de *Mycobacterium bovis* (NCTC 10772 lote 2017.00055 Culture Collections, adquirido por el SENASA), cepa vacunal BCG (NCTC 5692 Lote 2017.00055 Culture Collections), y ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC H37Ra, facilitado por el INCIENSA). Los fragmentos amplificados fueron analizados con el equipo de electroforesis capilar QiAxcel Advance (Qiagen) con el software QiAxcel Screengel Versión 1.5, método de inyección OL400, marcador de alineamiento: 15 a 600 pb, marcador de peso molecular: 25 a 500 pb, y el kit para el cartucho DNA High Resolution Kit. Entre las condiciones de reacción se incluyeron los cebadores que permiten una identificación específica para *M. bovis* (RD 1, 4, 9 y 12), los detalles tanto del diseño de reacción como del perfil de amplificación se especifican en material suplementario.

Las cepas de referencia (*M. bovis* y *M. bovis* BCG) fueron cultivadas en medio selectivo Stonebrink y verificadas por tinción Ziehl-Neelsen previo a ser utilizado el material genético de estas (material suplementario). La extracción de material genético de las

cepas certificadas se realizó por la técnica de ebullición con previa disrupción mecánica con el equipo homogenizador BeadBug™-6 de BenchMark, con la siguiente programación: 4 ciclos a 4000 rpm durante 60 segundos, (4-4000-60s), con pausas definidas entre cada ciclo de 20 segundos, para un tiempo final de 4 minutos; posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos, colectando el sobrenadante (al menos 100 µL) en microtubos de 1.5 mL; y se cuantificará por fluorimetría con el equipo Qubit 3.0 de Thermofisher y los reactivos del dsDNA HS Assay Kit, específico para la detección de ADN de doble hebra en un rango de (0.1-100) ng/uL (material suplementario). Todos los aislamientos compatibles (cultivo positivo) que se obtuvieron del periodo de estudio (2018-2021) fueron analizados con este PCR previa a enviar al USDA (mínimo 1 colonia resuspendida en 100- 200 uL de buffer TE 1X y se resguardaron en crioviales a -20 °C.

### **PCR dúplex Tiempo Real para la confirmación de *M. bovis***

Se optimizó un segunda PCR para escalar a la tecnología de Tiempo Real. Para ello se utilizó material genético de referencia *Mycobacterium bovis* (NCTC 10772) y *M. bovis* BCG (NCTC 5692); y el ADN de *M. tuberculosis* (ATCC H37Ra) y *M. africanum* (ATCC 35711), ambos facilitados por el INCIENSA. El material genético fue cuantificado con el equipo Qubit 3.0 y el kit Qubit dsDNA HS.

El diseño de este PCR se basó en lo descrito en las guías técnicas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés), adaptando a los recursos disponibles en el LANASEVE como reactivos y equipos. Este PCR tiene especificidad para la detección de dos regiones genéticas distintas: 1. Una región conservada para todo el complejo de bacterias causantes de tuberculosis (MTBC) IS1081 y 2. Una región conocida como Locus 3 (L3) que solo está presente en *M. bovis*. Se utilizó el equipo de PCR a Tiempo Real QuantStudio™ Flex 6 (Applied Biosystems), se seleccionó el programa estándar, y los parámetros mencionados en el material suplementario, allí también se encuentran las condiciones de la reacción.

Se evaluó la sensibilidad analítica, especificidad y eficiencia de la reacción de qPCR. Para conocer el límite de detección (sensibilidad analítica) de esta PCR se analizaron diluciones seriadas 1:10 desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$  del ADN de referencia de *Mycobacterium bovis* NCTC 10772 a una concentración inicial de 3,17 ng/μl. Se reportaron la eficiencia y sensibilidad analítica hasta encontrar el menor rango de número de copias en que es posible una detección positiva del agente infeccioso mediante PCR a Tiempo Real. Además, en Excel se procedió a registrar los valores de CT y se determinó la ecuación de la recta y con esta la eficiencia de cada uno de los ensayos blanco específicos, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%E = (10^{-1/\text{pendiente}}) \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Además de la eficiencia con la ecuación de la recta, se registró el valor para el intercepto y la pendiente, así como el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

También, la selectividad de la PCR (o especificidad) entre agentes MTBC se evaluó mediante una curva de disociación utilizando material genético de referencia de otras micobacterias miembros del MTBC, y se eligieron diluciones con concentraciones de 0.25-3 ng/μL. Las cepas analizadas fueron *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* y *M. africanum*.

### **Determinación de la variabilidad genética**

Para la secuenciación de las cepas de *M. bovis* se realizó un total de 3 envíos al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL) de la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de suspensiones bacterianas inactivadas por exposición a calor 90 °C durante 30 minutos, colocando 75 uL de cada muestra en tarjetas FTA (Whatman), enviadas a temperatura ambiente y su contramuestra en crioviales con un mínimo de 1 colonia resuspendidas en buffer TE 1X, en congelación a -20 °C. De todas las muestras enviadas en el NSVL se realizaron purificaciones de ADN y PCR a Tiempo Real para la confirmación de *M. bovis*, evaluar los valores CT, y calidad y pureza del material. Para la secuenciación se eligieron las muestras que cumplieran con los parámetros de calidad según requisitos del fabricante, requiriéndose un mínimo de 20μl de muestra, con una concentración mínima de 5ng/μl. Se utilizó la

plataforma MiSeq de Illumina, utilizando el kit NexteraXT para la preparación de librerías, el cual produce lecturas pareadas de 250 pb, y una cobertura de profundidad de 50-100X.

Las secuencias crudas (archivos FASTQ) obtenidas de los aislamientos de *Mycobacterium bovis* fueron analizadas mediante el software vSNP (<https://github.com/USDA-VS/vSNP>). En primer lugar, se evaluó la calidad de las lecturas generadas, excluyéndose aquellas que no alcanzaran una profundidad mínima de cobertura de 50X o que no presentaran la longitud esperada de 250 pb. Asimismo, se verificó la presencia de ambos pares de lectura (forward 5'-3' y reverse 3'-5') y se realizó el recorte de adaptadores para eliminar secuencias de baja calidad o artefactos técnicos para utilizarlas para el análisis. Se procedió a construir un árbol filogenético (herramienta RAxML que usa el pipeline VSNP) con secuencias de Costa Rica contrastando con algunas secuencias de genoma completo disponibles de México y Guatemala y como grupo externo secuencia de origen geográfico más distante como Canadá. Datos confidenciales del NSVL aún no publicados.

### **3. Resultados**

#### **Análisis del Cultivo**

Durante el período de estudio se recibieron un total de 337 solicitudes de análisis para cultivo microbiológico, correspondientes a 894 muestras clínicas. De estas solicitudes, un total de 117 solicitudes (34.7%) resultaron con al menos un aislamiento positivo, y en número de muestras equivale a 224 positivas para *M. bovis*. Por otro lado, 220 solicitudes (65.3%) no presentaron crecimiento microbiano, lo que equivale a 670 muestras sin crecimiento.

Del total de solicitudes de ensayo únicamente 8 (2,4%) registraron pulmón como otro órgano distinto a nódulos linfáticos (N: 329, 97,6%) como muestra recibida y en cuanto al número de muestras por solicitud se registra:  $\bar{x}=3$ ,  $\tilde{x}=1$ , rango=1-43.

Se analizó la tendencia de los resultados de cultivo de tuberculosis en el periodo de estudio, registrando porcentajes de muestras positivas por año para el agente de *M. bovis* alrededor de 10-20% del total de las muestras. Todas las muestras fueron cultivadas en medio Stonebrink con el método de descontaminación Kudoh (utilizando NaOH 4 %) (Jaspe et al., 2009).

**Cuadro 1.** Clasificación porcentual de los resultados las muestras analizadas por cultivo para tuberculosis bovina entre 2018-2021.

Año	Muestras totales	Muestras cultivo positivo	Muestras sin crecimiento	% de muestras positivas
2018	233	45	188	19.3 %
2019	289	51	238	17.6 %
2020	143	37	106	25.9 %
2021	230	25	205	10.9 %

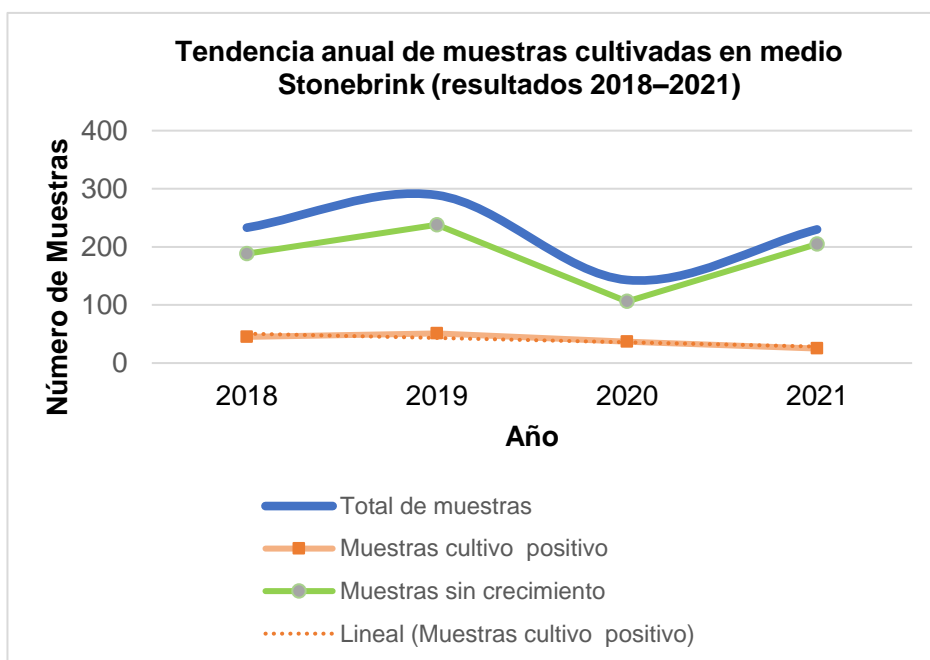


Figura 1. Comportamiento anual de las muestras cultivadas entre 2018 y 2021, con representación del total de cultivos y la proporción de resultados positivos y negativos. La línea punteada indica la tendencia lineal de los casos positivos.

Además, según el tipo de solicitud que se registró al ingresar las muestras se encontró lo siguiente:

**Cuadro 2.** Clasificación de las muestras recibidas de acuerdo con el tipo de solicitud (seguimiento de caso, saneamiento, diagnóstico y vigilancia en matadero), con los respectivos resultados positivos y negativos y el porcentaje de positividad para cada grupo.

Tipo de solicitud	Muestras totales	Muestras cultivo positivo	Muestras sin crecimiento	% muestras positivas
Seguimiento de caso	82	24	58	29.3%
Saneamiento	3	2	1	66.7%
Solicitud de diagnóstico	164	63	101	38.4%
Vigilancia en matadero	88	28	60	31.8%

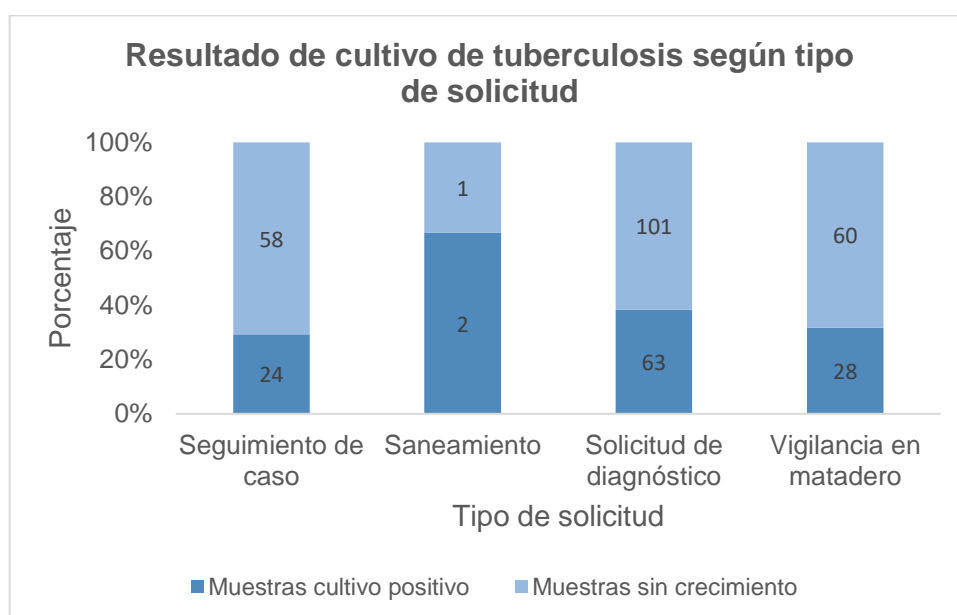


Figura 2. Representación porcentual del resultado del cultivo de tuberculosis bovina, según tipo de solicitud.

En términos porcentuales el total de muestras positivas según el tipo de solicitud (por motivo de seguimiento de caso, saneamiento y vigilancia en matadero) fue cercano a un 30% (29%-38%) a excepción de las registradas como motivo de saneamiento.

Por último; en cuanto a la distribución geográfica de las muestras reportadas como positivas para tuberculosis, se observa que el mayor número de muestras corresponden a la provincia de Alajuela, seguido de la provincia de San José, Heredia y con menor aparición las provincias de Limón, Cartago y Guanacaste. En el cuadro 3, se detallan la frecuencia de casos positivos según cantón encontrados y la figura 3 muestra la ubicación geográfica.

**Cuadro 3.** Distribución geográfica de las muestras con cultivo positivo para tuberculosis bovina por provincia y cantón.

<b>Provincia</b>	<b>Muestras cultivo positivo</b>	<b>Cantones registrados con muestras positivas</b>
<b>Alajuela</b>	102	San Carlos (83), Alajuela (5), Carrizal (1), Grecia (2), Naranjo (1), Upala (3), Zarcero (7)
<b>San José</b>	86	Goicoechea (54), Coronado (29), Pérez Zeledón (2), Desamparados (1)
<b>Heredia</b>	21	Sarapiquí (19), Heredia (2)
<b>Limón</b>	7	Pococí (3), Siquirres (2), Guácimo (2).
<b>Cartago</b>	5	Cartago (1), La Unión (1), Pacayas (1), Turrialba (1), El Guarco (1)
<b>Guanacaste</b>	1	Liberia (1)

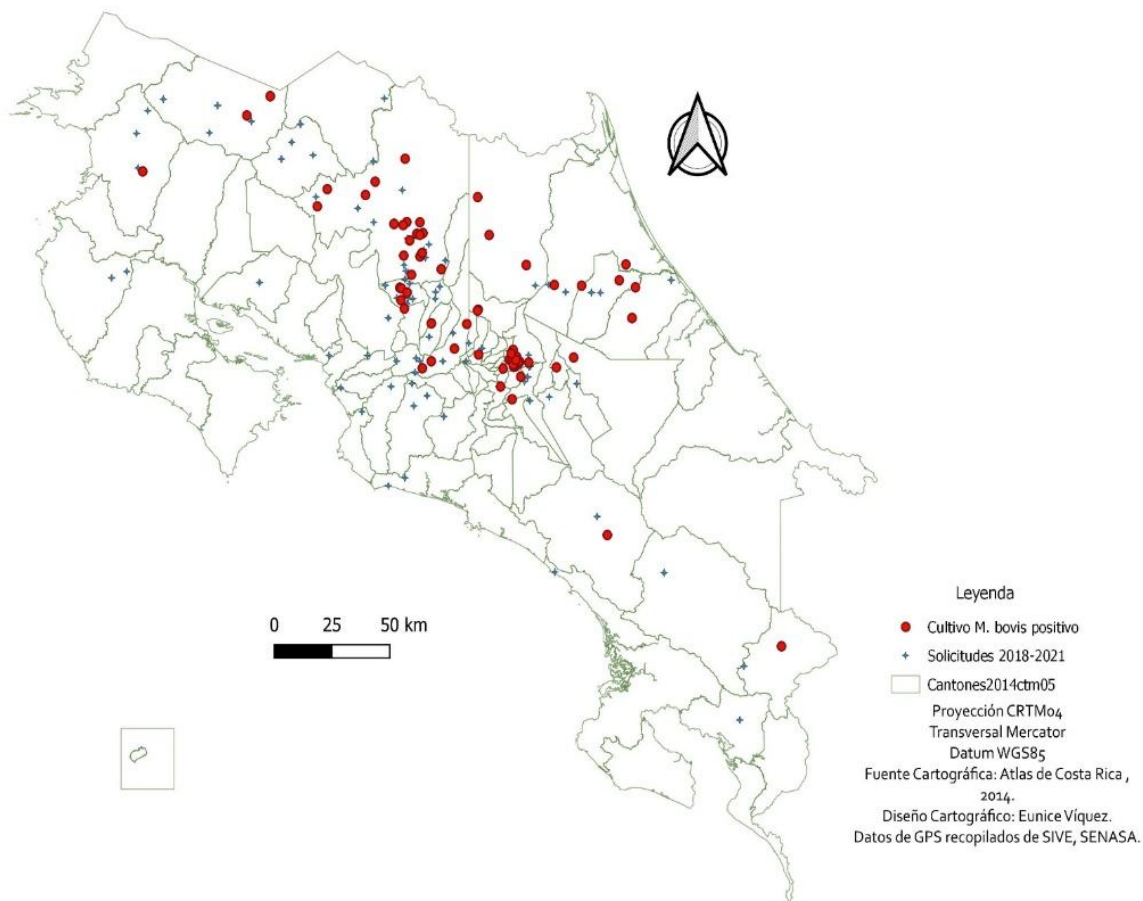


Figura 3. Procedencia geográfica de fincas bovinas con muestras con resultado de cultivo positivo para tuberculosis bovina en Costa Rica.

## Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina

### PCR múltiple en Tiempo Final

Con las condiciones controladas en el laboratorio y empleando material genético de referencia *M. bovis* NCTC 10772. Se logro obtener el perfil de amplificación específico para este agente, consistente con lo esperado según se detalla en el material suplementario.

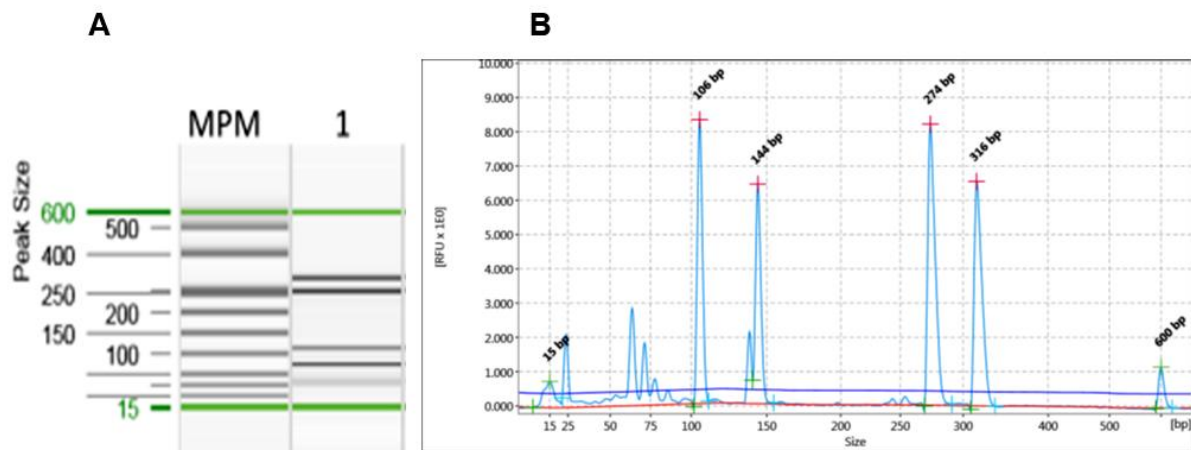


Figura 4. Electroforesis capilar del producto de amplificación esperado para especie de *Mycobacterium bovis*, A: vista del gel virtual: carril 1: *M. bovis* NCTC 10772. MPM: marcador de peso molecular. B: Electroferograma con determinación de tamaño de los fragmentos.

Se realizaron un total de 5 réplicas con diferentes eluidos de material genético registrando los siguientes resultados del análisis del tamaño de peso (pb) de los fragmentos amplificados con las condiciones elegidas para el equipo de electroforesis capilar QiAxcel Advance.

**Cuadro 4.** Comparación de los valores observados en la amplificación de las regiones RD1, RD4, RD9 y RD12 para *M. bovis*, mostrando medidas de dispersión y errores relativos y absolutos en relación con los tamaños esperados de los amplicones.

Perfil amplificación según RD para <i>M. bovis</i>	Media	Varianza (muestra)	Desv. estándar (muestra)	Error relativo (%)	Error absoluto promedio (pb)
RD1 (146 pb esperado)	147.2	1.7	1.3	0.82%	+1.2 pb
RD4 (268 pb esperado)	281.6	5.3	2.3	5.07%	+4.2 pb
RD9 (108 pb esperado)	112.2	0.7	0.8	3.89%	+13.6 pb
RD12 (306 pb esperado)	328.2	9.7	3.1	7.25%	+22.2 pb

En cuanto al tamaño determinado los amplicones de menor peso molecular: RD1 (147 pb) y RD9 (112 pb) presentaron valores promedio muy cercanos al esperado con baja

variabilidad entre los datos analizados, y para el caso de RD4 (281 pb) y RD12 (328 pb) la media determinada por las condiciones y el equipo QiAxcel Advance fueron desplazadas hacia arriba por 13 y 22 pb respectivamente. Todos los RD muestran baja variabilidad, y reproducibilidad interna es buena, lo cual es un excelente indicador del funcionamiento del capilar, valores totalmente aceptables para el sistema QiAxcel.

Al evaluar la sensibilidad analítica (límite de detección) utilizando diluciones seriadas de ADN de referencia, para este PCR se encontró que la menor concentración de material genético que permite una correcta identificación para *M. bovis* fue de 0,0124 ng/reacción (figura 5)

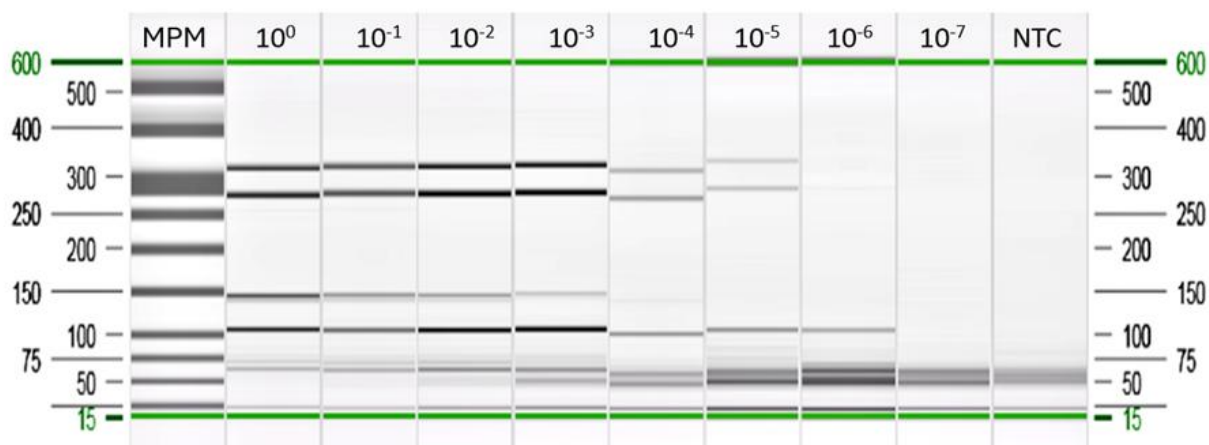


Figura 5. Serie de diluciones decimales utilizadas para evaluar sensibilidad analítica de PCR múltiple para la confirmación de *M. bovis*. Las concentraciones finales por reacción fueron:  $10^0 = 12,4 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^1$ ),  $10^{-1} = 1,24 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^0$ ),  $10^{-2} = 0,124 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^{-1}$ ),  $10^{-3} = 0,0124 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^{-2}$ ),  $10^{-4} = 0,00124 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^{-3}$ ),  $10^{-5} = 0,000124 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^{-4}$ ),  $10^{-6} = 0,0000124 \text{ ng}$  ( $1,24 \times 10^{-5}$ ). MPM: marcador de peso molecular. NTC: control de reactivos de PCR "no-template control".

Además, en cuanto a la especificidad en la identificación genética de especie de micobacteria este PCR permitió discriminar *M. bovis* de otras especies de micobacterias (*M. bovis* BCG NCTC 5692 y *M. tuberculosis* ATCC H37Ra).

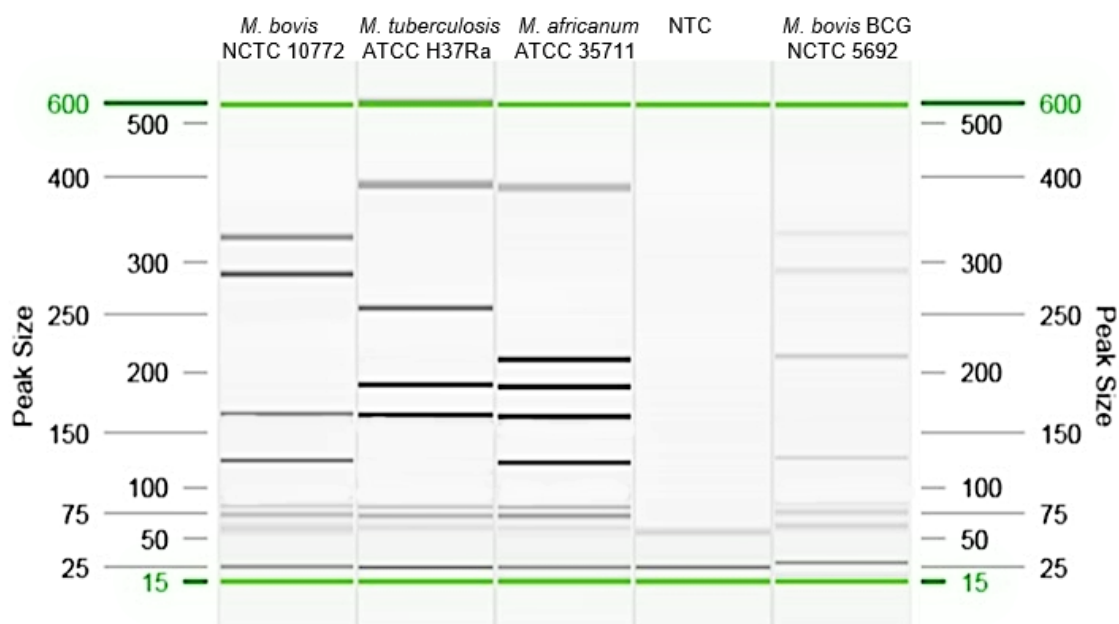


Figura 6. Selectividad de la PCR múltiple para la detección específica de *M. bovis* frente a otras micobacterias.

### PCR dúplex Tiempo Real para la confirmación de *M. bovis*

Se verificó el buen funcionamiento de este ensayo de PCR adaptado a las condiciones del laboratorio y utilizando ambas sondas tipo TaqMan (L3 y IS 1081) y además se evaluó la sensibilidad analítica o límite de detección para el ADN extraído de la cepa *M. bovis* NCTC 10772, reportándose lo siguiente: para IS 1081 en un CT de 36 y para L3 en un CT de 37,1 ambos encontrados en la dilución  $10^{-6}$  con 0,0000146 ng/reacción ( $1,46 \times 10^{-5}$  ng/reacción). La eficiencia fue de 1,78 para L3 y 1,76 para IS 1081, lo que indica que se superó el 100% de eficiencia, con valores de  $R^2$  superiores a 0.99 (figuras 7 y 8, y cuadro 5).

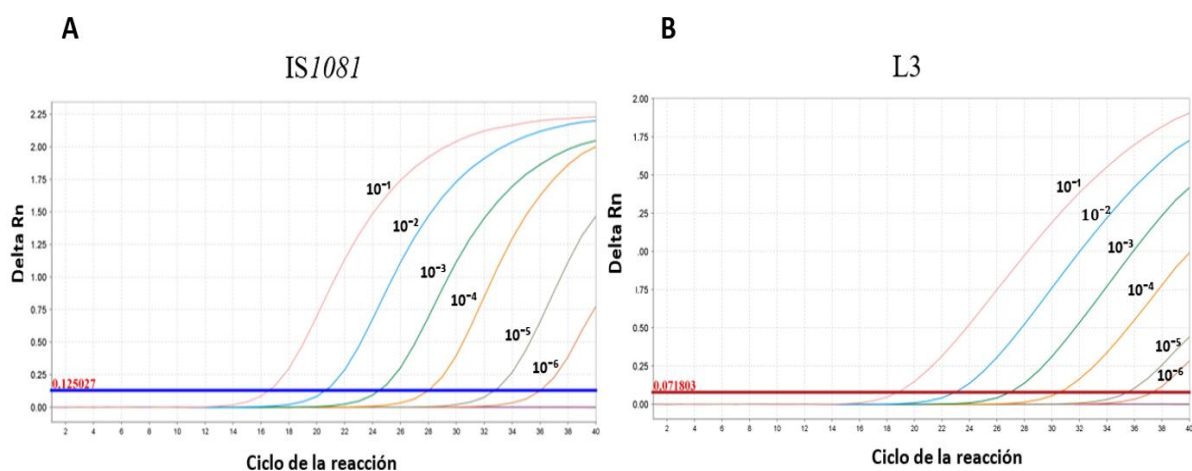


Figura 7. Curva de amplificación por PCR a Tiempo Real basado en diluciones seriadas en base 10 para ADN de referencia de *M. bovis* usando sondas tipo TaqMan: A. IS1081 y B. L3.

**Cuadro 5.** Datos de concentración de las diluciones de ADN de *M. bovis* de referencia y valores CT obtenidos en el análisis por PCR a Tiempo Real usando sondas TaqMan L3 y IS1081.

Dilución	Concentración	Log10(x)	Valor CT L3	Valor CT IS1081
10 <sup>0</sup>	14,55	1,16286299	13,4	11,2
10 <sup>-1</sup>	1,46	0,16435286	18,7	16,6
10 <sup>-2</sup>	0,146	-0,83564714	22,8	20,6
10 <sup>-3</sup>	0,0146	-1,83564714	26,8	24,5
10 <sup>-4</sup>	0,00146	-2,83564714	30,4	27,9
10 <sup>-5</sup>	0,000146	-3,83564714	35,3	32,7
<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>0,0000146</b>	<b>-4,83564714</b>	<b>37,1</b>	<b>35,9</b>

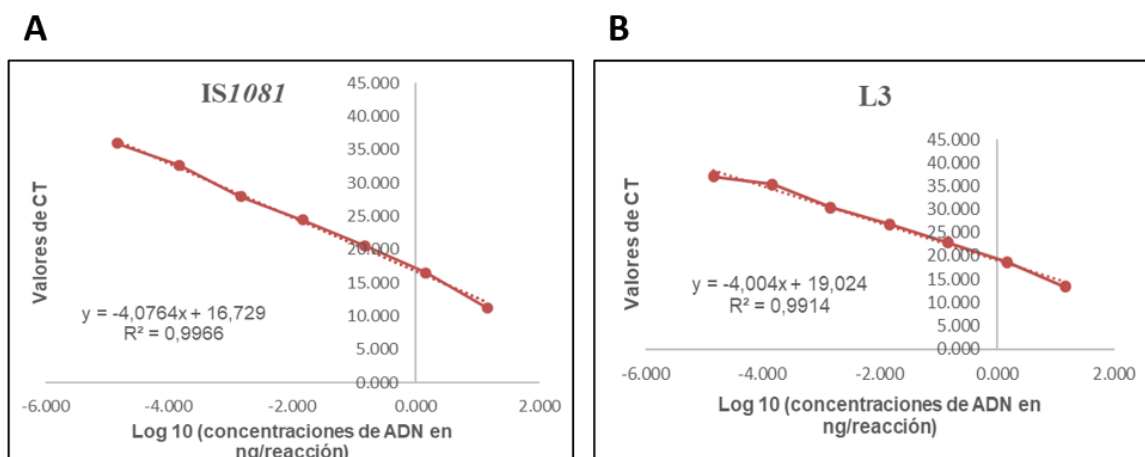


Figura 8. Ecuación de la recta para un ensayo de curva de amplificación analizado por PCR a Tiempo Real usando sondas TaqMan: A. IS1081 y B. L3.

En cuanto al ensayo de selectividad que evaluó la capacidad de este PCR para detectar la secuencia de inserción IS1081 sólo para *M. tuberculosis* y *M. africanum*; mientras que ambas regiones (L3 y IS1081) se detectaron para *M. bovis* y *M. bovis* BCG, lo que confirma que el fragmento L3, es específico de *M. bovis*, está presente tanto en la cepa silvestre como la variante vacunal (cuadro 6 y figura 9).

**Cuadro 6.** Valores de CT detectados de las regiones específicas para *M. bovis* y para miembros del complejo MTBC; así como la cantidad de ADN por reacción utilizado en este qPCR.

Especie de <i>Mycobacterium</i>	Cantidad de ADN ng/reacción	Valores CT		Interpretación
		Target <i>M. bovis</i> (L3)	Target MTBC (IS1081)	
<i>M. bovis</i> BCG NCTC 5692	4.76	17.07	15.60	Ambos detectados
<i>M. tuberculosis</i> ATCC H37Ra	1.25	Sin valor	18.51	Solo complejo MTBC detectado
<i>M. africanum</i> ATCC 35711	19.5	Sin valor	16.14	Solo complejo MTBC detectado
<i>M. bovis</i> NCTC 10772	14.55	13.84	13.84	Ambos detectados

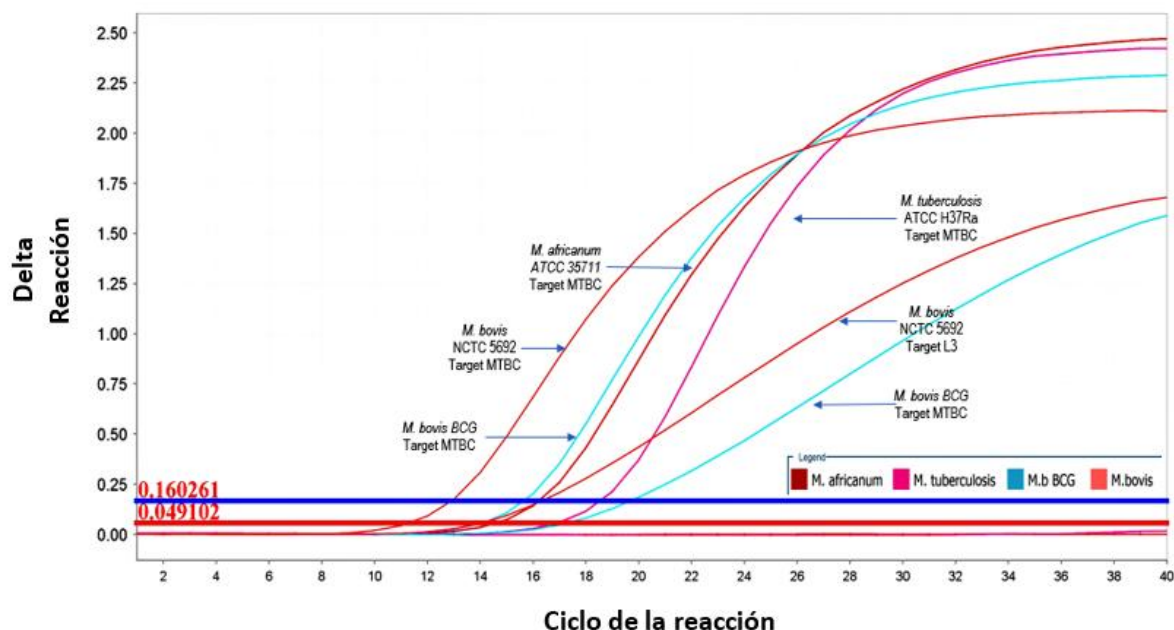


Figura 9. Curva de amplificación de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis* para la región L3 y la secuencia de inserción IS1081.

### Determinación de la variabilidad genética

Los primeros dos envíos de muestras se realizaron en el 2020, en los meses de mayo (60 muestras) y noviembre (37 muestras), y el tercer envío en agosto del 2022 (56 muestras), para un total de 154 cepas previamente confirmadas en el laboratorio. Del primer envío se confirmó la detección por PCR a Tiempo Real para el 86.7 % de las muestras enviadas (N: 52, no detectadas: 9), del segundo 94.6% (N: 35, no detectadas: 2) y del tercer 94.6% (N:53, no detectadas: 3; 2 cepas de aislamiento en humanos). En el caso del primer envío se registró problemas para llegar al lugar de destino y rompimiento de las condiciones ambientales para este envío. El total de cepas enviadas fue de 154 y de estas 140 (91%) fueron detectadas como *M. bovis* por PCR a Tiempo Real, 14 no se logró detectar (alrededor de un 7%). Del total de las 140 muestras detectadas, 73 muestras (52%) cumplieron con los parámetros de calidad y registraron valores CT entre 10-22 y pasaron a secuenciación, sin embargo 16 secuencias presentaron una baja cobertura por lo que se procedió a seleccionar solo

aquellas que presentaron la cobertura mínima de 50X (57 secuencias; 26 del segundo y 31 del tercer envío, ninguna del primero), para el análisis de variabilidad genética.

Del total de 57 genomas de *Mycobacterium bovis* analizados mediante el enfoque de polimorfismos de nucleótido único (SNP), se observó que todos los aislamientos de origen analizados pertenecen al linaje Europeo 1 de la clasificación clásica de complejos clonales. Esto reveló una marcada homogeneidad genética (incluso con uno de los de origen humano). Por agrupamiento geográfico para las cepas de Costa Rica, el análisis basado en SNP se distinguió con la etiqueta Mbovis-07 (n = 56), con marcada predominancia de un sublinaje Mbovis-07A (n = 54). En contraste, uno de los dos aislamientos de origen humano se agrupó dentro de otro clúster diferente a los demás mostrando similitud con secuencias de cepas de origen guatemalteco (datos no mostrados).

Como se demuestra en la figura 10, se evidenció una estrecha relación genética entre los aislamientos bovinos costarricenses, con una diversidad intra-linaje inferior a 20 SNP, lo que indica un bajo grado de variación genómica y sugiere la circulación de cepas estrechamente relacionadas o de posible origen común. La comparación con aislamientos de *M. bovis* del mismo linaje procedentes de Guatemala y México (Mbovis-07) mostró una distancia genética moderada, mientras que los aislamientos de Canadá se ubicaron como un grupo más divergente, empleado como referencia externa para enraizar el árbol filogenético. Datos genómicos confidenciales de los países participantes NVSL, USDA).

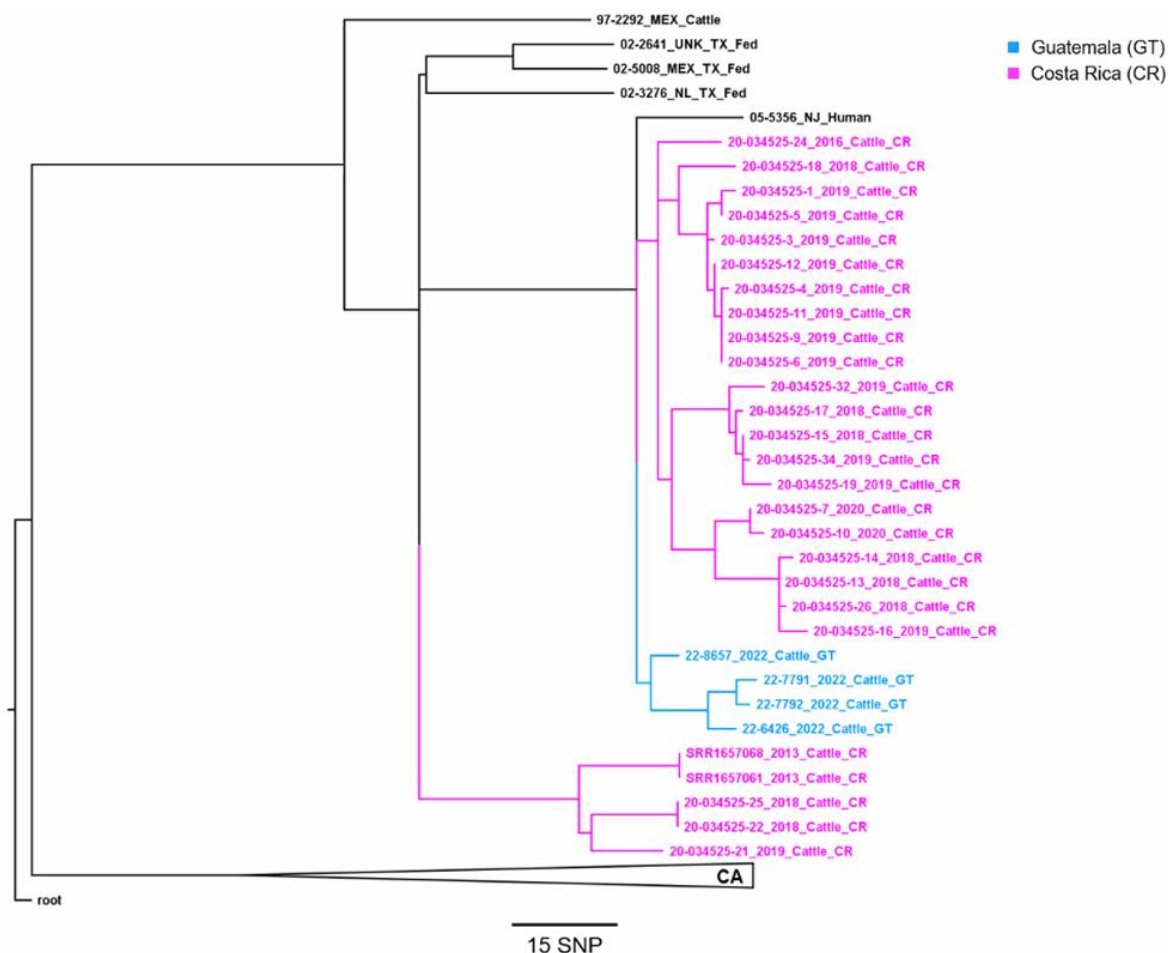


Figura 10. Árbol filogenético de aislamientos de *Mycobacterium bovis* del linaje Mbovis-07A. Representación filogenética basada en análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) obtenidos a partir de secuenciación de genoma completo de aislamientos procedente de bovinos en Costa Rica, comparados con aislamientos representativos de Guatemala, México y Canadá. El árbol muestra la agrupación de los aislamientos costarricenses dentro del linaje Mbovis-07A, con una baja divergencia genética entre ellos ( $\leq 20$  SNP). Los aislamientos de Canadá se agrupan como un clado más divergente (grupo externo). Realizado por el NSVL, USDA.

## 4. Discusión

### Análisis del Cultivo

Los resultados obtenidos evidencian una frecuencia considerable de aislamientos positivos de *Mycobacterium bovis* en las muestras procesadas entre 2018 y 2021, con un 34.7% de solicitudes con al menos un aislamiento positivo. Este hallazgo sugiere que la tuberculosis bovina continúa siendo un problema sanitario relevante en el país,

con presencia activa del agente en distintos sistemas productivos, lo cual coincide con lo descrito por estudios previos realizados en Costa Rica y otros países de la región (Ramírez et al., 2017; Chacón et al., 2020).

Bajo el supuesto que la mayoría de muestras fueran candidatos ideales de aislamiento, estos resultados se encuentran cercanos a los esperados, según la sensibilidad del medio de cultivo utilizado, el Stonebrink, el cual muestra un 43%, lo cual limita significativamente la confirmación de los casos utilizando esta metodología. Se sabe en la realidad, que los aislamientos de *M. bovis* son difíciles de obtener dada la baja sensibilidad del medio y la viabilidad del agente en la muestra, que puede verse afectada con el proceso de descontaminación de las mismas (Corner et al., 2012, Madeiros et al., 2010); así como la selección de la muestra y grado de compatibilidad con síntomas presentes y clásicos de la enfermedad para el análisis del laboratorio.

La distribución anual mostró variabilidad en la proporción de muestras positivas, con valores entre 10.9% y 25.9%, sin una tendencia lineal definida. Esta fluctuación podría estar relacionada con cambios en la intensidad de la vigilancia, campañas de saneamiento, variaciones en el número de muestras remitidas, o grado de compatibilidad macro de lesiones o presentación en las muestras. El pico observado en 2020 (25.9%) podría reflejar un mayor enfoque en casos sospechosos o en zonas con antecedentes de brotes, aumento en casos por vigilancia con otras pruebas como Interferón Gamma o tuberculina en campo, mientras que el descenso en 2021 podría deberse a la reducción de la actividad diagnóstica por la pandemia de COVID-19, tal como ha sido reportado en otros programas de salud animal (FAO, 2021; WHO, 2021).

El predominio de muestras de nódulos linfáticos (97.6%) sobre otras muestras como pulmón es consistente con el protocolo de diagnóstico de tuberculosis bovina, dado que las lesiones tuberculosas suelen localizarse principalmente en linfonodos retrofaríngeos y mediastínicos, donde la probabilidad de aislamiento es mayor (OIE, 2019). La baja proporción de muestras pulmonares podría deberse a la dificultad para identificar lesiones macroscópicas en matadero, que las lesiones fueran microscópicas, o al enfoque de muestreo en animales con sospecha linfática.

En relación con el tipo de solicitud, los mayores porcentajes de positividad se observaron en las muestras provenientes de solicitudes de diagnóstico (38.4%) y de vigilancia en mataderos (31.8%), lo que refuerza la importancia del sistema de vigilancia pasiva y del control en centros de sacrificio como herramienta clave para la detección de animales infectados. Aunque el número de muestras provenientes de saneamiento fue bajo, en dos de tres solicitudes se logró aislamiento y esto podría evidenciar la persistencia del agente en hatos previamente afectados, lo cual destaca la necesidad de un seguimiento más estricto de las fincas intervenidas.

Geográficamente, la provincia de Alajuela concentró la mayor cantidad de aislamientos positivos (102), seguida de San José (86) y Heredia (21). Este patrón podría estar asociado con la alta densidad ganadera y la concentración de explotaciones lecheras en estas regiones, lo que incrementa el riesgo de transmisión entre animales y entre fincas, tal como han señalado informes previos del SENASA y estudios regionales (Chacón et al., 2020; Ramírez et al., 2017). La identificación de cantones con mayor frecuencia de casos, como San Carlos y Goicoechea, permite priorizar zonas de riesgo y orientar las acciones de vigilancia epidemiológica y control sanitario. Este patrón sugiere la existencia de focos endémicos que requieren una vigilancia epidemiológica más focalizada y sostenida, complementada con medidas de control de movilización animal y pruebas periódicas de intradermotuberculinización.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de mantener e incluso fortalecer las estrategias de vigilancia activa y pasiva para *M. bovis* en Costa Rica, así como promover el control de movimientos de animales, la trazabilidad de focos y la evaluación periódica de las medidas de saneamiento, constante capacitación del personal que toma muestras para el laboratorio e implementación de mejoras en los procesos diagnósticos del laboratorio para poder recuperar mayor cantidad de aislamientos de los casos que ingresan para análisis.

## Confirmación molecular del agente causal de tuberculosis bovina

### PCR múltiple en Tiempo Final

El diseño del PCR múltiple en Tiempo Final es basado en la ausencia (deleciones) o presencia de regiones específicas del genoma llamadas Regiones de Diferencia Cromosómica (RD). Las deleciones en estas regiones variables permiten la identificación de bacterias del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* diferenciando entre las especies: *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* y *M. bovis* cepa vacunal BCG. Las condiciones optimizadas permitieron confirmar específicamente aislamientos *M. bovis*. Si bien la determinación de pesos moleculares obtenidos en el caso de 2 regiones RD con las condiciones de electroforesis capilar no fue tan cercana a la esperada, la baja variabilidad y buena reproducibilidad interna y porcentaje de error relativo menor al 10%, sugieren que estos serían los valores reales esperados bajo las condiciones metodológicas utilizadas. El desplazamiento de 1-3 pb en la determinación de peso de fragmentos amplificados es normal para fragmentos pequeños menores a 150 pb, y están dentro del rango de precisión del kit (Caso del RD 1 y RD9), para los fragmentos amplificados de las regiones RD 4 y RD 12 se presentó desplazamiento mayor a lo esperado, pues QiAxcel suele presentar desviaciones de  $\pm 7-10$  pb para fragmentos mayores a 300 pb, con el DNA High Resolution Kit, sin embargo el error obtenido sigue estando dentro de lo aceptable para aplicaciones de identificación molecular. Se sugiere que algunos detalles técnicos podrían inferir en estos resultados, como ligero deterioro de cartucho por uso. El método de inyección OL400 podría ser más sensible a pequeñas variaciones de concentración o viscosidad, el marcador de peso molecular (25–500 pb) podría no estar corrigiendo completamente el rango medio; no obstante, la reproducibilidad interna usando material genético de *M. bovis* de referencia es muy buena. El mayor porcentaje de error no representan problemas de reproducibilidad, sino de desplazamiento sistemático en los fragmentos RD4 y RD12. El equipo, bajo las condiciones optimizadas probablemente presenta desplazamiento en el rango 250–350 pb.

## PCR dúplex a Tiempo Real

Las condiciones estándares para la reacción de PCR permitieron una correcta detección del agente *M. bovis* y estas se basaron en las guías técnicas del USDA y recomendaciones de fabricante del reactivo TaqMan 2X universal PCR Master Mix, el cual contiene la Taq polimerasa específica (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase), y que para su correcto funcionamiento recomienda parámetros de precalentamiento y alineamiento a los 60 grados. Además, es importante realizar el análisis con el Rox como referencia pasiva antes de exportar los datos de CT obtenidos; ya que proporciona mejores resultados y reduce efectivamente la inespecificidad; a su vez permite que la combinación quencher-fluoróforo sea más compatible (Martínez et al., 2022).

Se obtuvieron valores superiores al 100% de Eficiencia con ambas secuencias target de las sondas para el PCR a Tiempo Real y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) (cercano a 1 significa un excelente ajuste lineal, es decir confianza en la correlación entre X y Y). Cuando no se logran estos valores; las razones más comunes de obtener eficiencias bajas son, un mal diseño del cebador y concentraciones de reactivos o condiciones no óptimas de reacción. Si se produce la formación de estructuras secundarias como dímeros y horquillas o temperaturas de fusión inadecuadas, pueden afectar el recocido cebador-plantilla, lo que resulta en una amplificación deficiente (Lorenz, 2012). Dado que cada dilución adicional contiene cantidades iniciales de ADN apropiadamente más bajas, se producen diferencias entre los valores de CT en muestras diluidas en serie (Urška, 2017).

El análisis de la selectividad de la PCR en tiempo real permitió evidenciar la especificidad de ambas regiones evaluadas, la IS 1081 y el Locus 3, según lo esperado para cada especie de micobacteria causante de MTBC. Es importante mencionar que el target o blanco dirigido al Locus 3, se basa en la delección de la región cromosómica RD4, perfil distintivo para *M. bovis* junto con la RD9; y con base en estas delecciones genómicas y el espoligotipo, *Mycobacterium bovis* se clasifica en varios grupos de

genotipos llamados complejos clonales (CC): Africano1 (AF1), Africano2 (AF2), Europeo 1 (EU1) y Europeo 2 (EU2) (Yahyaoui Azami et al., 2025).

### **Determinación de la variabilidad genética**

El análisis de los 57 genomas *Mycobacterium bovis* de este estudio reveló una marcada homogeneidad genética. La totalidad de estos aislamientos correspondió al linaje Europeo 1 de la clasificación clásica de los complejos clonales, y en específico el clúster para los aislamientos de Costa Rica se agrupó con la etiqueta del linaje geográfico nombrado como Mbovis-07 (según análisis con bases de datos del USDA no mostrado en su totalidad); dentro de este, predominó ampliamente el sublinaje Mbovis-07A (n = 54). Para clasificar *Mycobacterium bovis* mediante la identificación de complejos clonales se han establecido cuatro CCs (Africano 1, Africano 2, Europeo 1 y Europeo 2) definidos por deleciones específicas de entre 806 y 14.094 pb. Estos CCs muestran distribuciones geográficas marcadas: Africano 1 y 2 se encuentran restringidos a África, Europeo 2 es común en la Península Ibérica y Europeo 1 presenta una distribución global (Zimpel et al., 2020). Aunque la clasificación clásica sigue siendo importante, estudios basados en secuenciación del genoma completo han evidenciado que no todos los aislados pueden clasificarse dentro de estos complejos, pues no se clasifica toda la diversidad genética de *M. bovis*. Un análisis filogenético global más amplio, realizado por Zimpel et al. (2020) utilizando 1.969 genomas de *M. bovis* de diversos países, propuso cuatro linajes globales (“Lb1”, “Lb2”, “Lb3” y “Lb4”), los cuales no se superponen completamente con los complejos clonales clásicos, mostrando una estructura filogenómica más compleja de la esperada.

Para las cepas de bovinos de Costa Rica, la diversidad intra-linaje fue baja, con diferencias inferiores a 20 SNP, lo que indica persistencia de cepas de *M. bovis* estrechamente relacionadas y sugiere la circulación de un linaje dominante. Este patrón es característico de escenarios donde la transmisión es mayoritariamente local, sostenida y con limitada introducción de variantes exógenas, situación compatible con los sistemas productivos nacionales; en donde, a pesar de los estrictos programas de

prueba y sacrificio, el movimiento del ganado todavía puede impulsar la diseminación de tuberculosis bovina entre rebaños (Yahyaoui Azami et al., 2025).

La presencia de un aislamiento de *M. bovis* en un humano perteneciente a un linaje distinto aporta un hallazgo relevante desde el enfoque de una sola salud. La falta de relación genética con el linaje predominante en bovinos sugiere una posible fuente alternativa de exposición, la cual podría incluir contacto con animales infectados en otros países, consumos de productos no pasteurizados, o transmisión ocupacional no vinculada al Mbovis-07A circulante. Este resultado evidencia la necesidad de integrar la vigilancia genómica animal y humana para comprender de manera más precisa las rutas de transmisión zoonótica.

Por otra parte, la ausencia de secuencias útiles del primer envío, atribuible a fallas en las condiciones de transporte y ruptura de la cadena logística, evidencia la importancia crítica de asegurar una adecuada conservación del material biológico. La pérdida de estas muestras limita la representatividad temporal del análisis y refuerza la necesidad de fortalecer los protocolos de envío, almacenamiento y estandarizar la preparación de suspensiones bacterianas para estudios genómicos futuros, para garantizar que material, que es difícil de obtener en cantidad y calidad cumpla con criterios de calidad.

La baja variabilidad genética observada entre los aislamientos costarricenses concuerda con reportes internacionales que describen la circulación de linajes relativamente estables de *M. bovis* en regiones donde la tuberculosis bovina se mantiene como enfermedad endémica. Si bien esta homogeneidad facilita la identificación de clústeres de transmisión, también implica un riesgo de persistencia si no se combinan las acciones de vigilancia genómica con medidas de control sanitario robustas, seguimiento epidemiológico y trazabilidad de movimientos de animales. La comparación con secuencias de Guatemala y México mostró distancias genéticas moderadas, mientras que el grupo externo de Canadá se ubicó como un clado claramente divergente, lo cual reafirma la utilidad del análisis filogenético para contextualizar los aislamientos locales dentro de un marco regional. En el estudio de

Guimaraes y Zimpel (2020) sobre retos de WGS para *M. bovis*, también se discute cómo la estandarización de la nomenclatura de linajes/clusters todavía está en evolución.

En conjunto, estos hallazgos demuestran el valor de la secuenciación de genoma completo (WGS) como herramienta para comprender la microevolución de *M. bovis*, identificar patrones de transmisión clonal y detectar posibles introducciones de nuevos linajes al país. La implementación sistemática de la vigilancia molecular y genómica, acompañada de información epidemiológica, geoespacial y de movilidad animal, permitirá fortalecer la capacidad nacional para la trazabilidad de brotes, la detección temprana de variantes emergentes y la toma de decisiones informadas en los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina en Costa Rica y la región centroamericana.

## **5. Conclusiones**

La detección sostenida de *Mycobacterium bovis* entre 2018 y 2021 confirma la persistencia de la tuberculosis bovina en Costa Rica, con mayor concentración en zonas de alta producción pecuaria como en las provincias de Alajuela y San José. Estos hallazgos resaltan la necesidad de fortalecer la atención epidemiológica, el seguimiento post-saneamiento y las medidas de bioseguridad en zonas prioritarias.

La vigilancia en matadero sigue siendo una estrategia importante para la detección activa de la tuberculosis bovina, y el diagnóstico del laboratorio como herramienta confirmatoria es de especial atención para la articulación de estrategias del programa de control nacional.

Las técnicas moleculares optimizadas (PCR múltiple en tiempo final y *q*PCR) para la confirmación de *M. bovis*, constituyen herramientas confiables para el diagnóstico. Y la secuenciación del genoma completo permitió conocer la variabilidad genética de circulante de cepas de *M. bovis* en Costa Rica, aportando evidencia útil para estudios epidemiológicos.

## Referencias

Chacón, C., Ramírez, L. y Solano, E. (2020). Situación epidemiológica de la tuberculosis bovina en Costa Rica: avances y desafíos. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 38(2):45–53. <https://doi.org/10.15517/rcv.v38i2.XXXX>

Corner, L. A. L., Gormley, E. y Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary microbiology*, 156(1-2):162-171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>

Gomez-Buendia, A., Romero, B., Bezos, J., Lozano, F., de Juan, L. y Alvarez, J. (2021). Spoligotype-specific risk of finding lesions in tissues from cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02848-3>

Guimaraes, A. M. y Zimpel, C. K. (2020). *Mycobacterium bovis*: from genotyping to genome sequencing. *Microorganisms*, 8(5): 667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>

Jaspe, R. C., Rojas, Y. M., Flores, L. A., Sofia Toro, E., Takiff, H. y De Waard, J. H. (2009). Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas. *Tropical Medicine & International Health*, 14(4):468-471. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02236.x>

Lorente-Leal, V., Pozo, P., Bezos, J., Collado, S., Vicente, J., Stuber, T., Álvarez, J., de Juan, L. y Romero, B. (2025). Revisiting *Mycobacterium bovis* SB0121 genetic diversity reflects the complexity behind bovine tuberculosis persistence in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 239,106519. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2025.106519>.

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, 22(63): e3998. <https://doi:10.3791/3998>.

Medeiros, L. dos S., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E. y Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 531-541. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000002>

Martínez, L. B., Pernaute, M. M. y Cabeza, P. Á. (2022). *qPCR multiplex para la detección de polimorfismos de la hemocromatosis hereditaria*. [Tesis de posgrado, Universidad de Zaragoza, España]. <https://zaguan.unizar.es/record/124548/files/TAZ-TFM-2022-1403.pdf>

Navarro García, Y. (2016). *Detección, caracterización y análisis funcional de la complejidad clonal en la tuberculosis humana y bovina*. [Tesis de posgrado, Universidad Complutense de Madrid, España]. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/27437>

Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). Impacto de la pandemia por COVID-19 en los programas de sanidad animal en América Latina. <https://www.fao.org/documents/card/es/c/cb5584es>

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2019). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres: Tuberculosis bovina. París: OIE. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/estandares/manual-terrestre/>

Ramírez, L., Arce, M. y Mora, C. (2017). Caracterización de aislamientos de *Mycobacterium bovis* en explotaciones ganaderas costarricenses. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 35(1);23–31. <https://doi.org/10.15517/rcv.v35i1.XXXX>

Souza Filho, A. F. D. (2019). *Diversidade genética de isolados de Mycobacterium bovis em rebanhos bovinos de diferentes localidades do Brasil*. [Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, Brasil].

[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-25092019-145311/publico/Antonio\\_Francisco\\_de\\_Souza\\_Filho\\_original.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-25092019-145311/publico/Antonio_Francisco_de_Souza_Filho_original.pdf)

Urška, Č. (15 de noviembre de 2017). Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%. *BioSistemika*. <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>

World Health Organization. (2021). *COVID-19 pandemic and TB*. En *Global tuberculosis report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>

Villavicencio Villavicencio, D. C. y Luna Herrera, J. K. (2021). *Identificación de Mycobacterium bovis mediante análisis microbiológico y molecular, en bovinos faenados en la ciudad de Loja*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja, Ecuador]. <https://dspace.unl.edu.ec/server/api/core/bitstreams/353712b7-a6bd-4c6f-8019-139b05af38ef/content>

Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M. y Van Helden, P. D. (2006). Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(7), 818-2. <https://www.researchgate.net>

World Health Organization. (2021). *COVID-19 pandemic and TB*. En *Global tuberculosis report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>

Yahyaoui Azami, H., Perea, C., Stuber, T., Bouslikhane, M., Berrada, J., Aboukhassib, H., Allepuz Palau, A. O., Reis, A. C., Cunha, M. V., Thacker, T. C., Robbe-Austerman, S., Salvador, L. M.C. y Quinn, F. D. (2025). El análisis filogenético de *Mycobacterium bovis* revela la propagación de la tuberculosis animal y zoonótica entre Marruecos y países europeos. *PLoS Negl Trop Dis*, 19(2): e0011982. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011982>

Zimpel, C. K., Patané, J. S. L., Guedes, A. C. P., de Souza, R. F., Silva-Pereira, T. T., Camargo, N. C. S., de Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Ferreira Neto, J. S., Setubal, J. C., Heinemann, M. B. y Guimaraes, A. M. S. (2020). Global distribution and evolution of *Mycobacterium bovis* lineages. *Frontiers in microbiology*, 11, 843. <https://doi:10.3389/fmicb.2020.00843>

## Material suplementario

### Confirmación molecular y variabilidad genómica de *Mycobacterium bovis* aislado por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (2018–2021)

#### Procedimiento para el cultivo de micobacterias en medio selectivo y tinción de Ziehl–Neelsen modificada (en frío)

##### A. Elaboración del medio de cultivo selectivo Stonebrink

Para la preparación del medio selectivo Stonebrink se emplean los siguientes reactivos para la solución base:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato diácido de potasio): 1,166 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato disódico anhidro): 0,666 g
- Piruvato de sodio: 2,083 g
- Agua destilada: 146,6 mL (agitar hasta disolver y autoclavar)
- Solución de verde malaquita: 0,2 g de colorante en 20 mL de agua destilada; mezclar y autoclavar por 15 min.
- Huevos: deben estar frescos, sin lesiones en la cáscara. Lavar con agua y jabón, posteriormente con agua destilada y dejar escurrir. Colocar en un beaker y cubrir completamente con alcohol al 70%; dejar en contacto durante 15 min.

Procedimiento:

Todo el procedimiento debe realizarse bajo condiciones estrictas de esterilidad y dentro de una cámara de bioseguridad.

1. Romper los huevos en el borde del beaker y transferirlos a una licuadora esterilizada hasta obtener 333,3 mL (aprox. 8–9 huevos).
2. Agregar la solución base y la solución de verde malaquita (correspondientes a 1 L), mezclando previamente cada solución con movimientos circulares.
3. Licuar la mezcla con pulsos cortos, evitando la formación de burbujas.
4. Distribuir de 4 a 6 mL del medio en tubos de vidrio esterilizados.

5. Colocar los tubos inclinados en un horno de secado a 80–100 °C hasta solidificación.
6. Dejar enfriar, tapar y refrigerar.

Nota: Las micobacterias (cepas comerciales resuspendidas según indicación del fabricante) se siembran en Stonebrink empleando un asa bacteriológica estéril dentro de una cámara de bioseguridad tipo II B2. Los cultivos se incuban a 37 °C durante al menos 3 semanas con observación semanal.

### **Confirmación de micobacterias mediante tinción de Ziehl–Neelsen modificada (en frío)**

Se utiliza el kit Tb-color (Merk). El procedimiento es el siguiente:

1. Fijar un extendido bacteriano por calor en un portaobjetos dentro de una placa Petri. El extendido puede realizarse con asa estéril y solución salina.
2. Aplicar fucsina fenicada durante 5 min.
3. Lavar con abundante agua.
4. Aplicar solución decolorante (ácido sulfúrico), alternando con lavados suaves.
5. Teñir con azul de metileno por 1 min.
6. Lavar y dejar secar.

Realizar la lectura en microscopio de luz con objetivo 100x y aceite de inmersión.

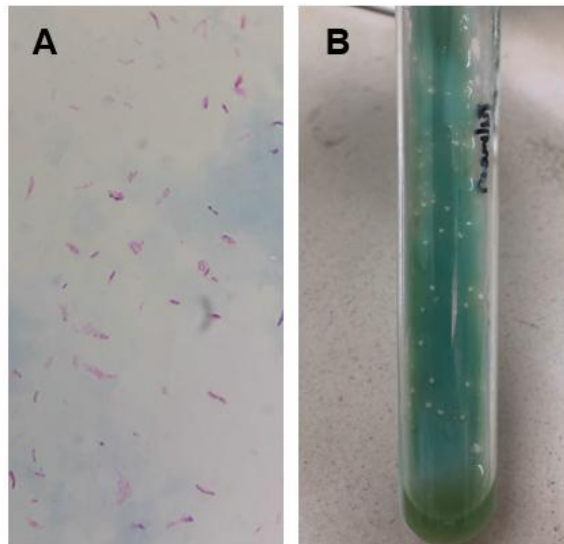


Figura S1. Cultivo cepa de referencia y tinción de Ziehl–Neelsen: A. Tinción de Ziehl-Neelsen modificada Kinyoun para *Mycobacterium bovis* NCTC 10772. B. Cultivo de *Mycobacterium bovis* NCTC 10772 en medio Stonebrink.

### **Extracción de material genético por la lisis térmica**

Recolectar crecimiento bacteriano en medio sólido y resuspenderlo en buffer T.E. 1X (mínimo 100  $\mu$ L), dentro de una cámara de bioseguridad tipo II B2.

1. Verificar el cierre de los crioviales y llevar a ebullición (95–100 °C) durante 30 min usando bloque seco, baño maría o beaker con termómetro.
2. Centrifugar 3 min por 8 000 rpm o tomar el sobrenadante si no hay restos visibles.
3. Cuantificar el ADN obtenido (ver siguiente punto).

Nota: con esta técnica el ADN no se purifica; las bacterias quedan rotas, y lo único que queda es el AND libre, por lo cual el sobrenadante puede utilizarse directamente en PCR.

## Cuantificación de ADN por Fluorimetría con el Equipo Qubit utilizando dsDNA HS Assay Kit

1. Preparar la solución de trabajo calculando el volumen requerido según la cantidad de muestras a cuantificar e incluir los estándares. Por cada muestra se requiere 199  $\mu\text{L}$  de Qubit buffer más 1  $\mu\text{L}$  de Qubit reagent.
2. Para cada estándar se requiere 190  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo por 10  $\mu\text{L}$  del estándar.
3. De las muestras de ADN se puede utilizar de 1  $\mu\text{L}$  a 20  $\mu\text{L}$ , y completar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  con la solución de trabajo previamente preparada.
4. Leer las muestras en el equipo Qubit. Registrar la cantidad de ADN en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y evaluar si es apto para el uso en la PCR.

## PCR múltiple en punto final para la confirmación molecular de *Mycobacterium bovis*

**Cuadro S1.** Secuencias de cebadores utilizados para amplificación de Regiones de Diferencia (RD) del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Cada región RD se amplifica mediante un conjunto de tres cebadores (forward, reverse e interno), presentados como un único bloque dado su uso simultáneo en la reacción.

Región de diferencia	Secuencias nucleotídicas (5'–3') *
RD1	AGCGGTTGCCGCCGACCGACC / CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG / GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG /
RD4	ATGTGCGAGCTGAGCGATG / TGTAATGCTGACCCATGCG / AAAGGAGCACCATCGTCCAC /
RD9	CAAGTTGCCGTTTCGAGCC / CAATGTTTGTGCGCTGC / GCTACCCTCGACCAAGTGTT /
RD12	GGGAGCCAGCATTACCTC / GTGTTGCGGGAATACTCGG / AGCAGGAGCGGTTGGATATTC /

**Cuadro S2.** Perfiles genéticos esperados para especies del complejo MTBC mediante PCR múltiple

Región de diferencia	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
RD1	Presente (146 pb)	Presente (146 pb)	Ausente (196 pb)

<b>RD4</b>	Presente (172 pb)	Ausente (268 pb)	Ausente (268 pb)
<b>RD9</b>	Presente (235 pb)	Ausente (108 pb)	Ausente (108 pb)
<b>RD12</b>	Presente (369 pb)	Ausente (306 pb)	Ausente (306 pb)

**Cuadro S3.** Mezcla de reacción utilizada en la PCR múltiple

Reactivo	Volumen (µL)
Master Mix HotStart (Promega)	12.0
Cebadores RD1 (20 µM)	0.8 × 3
Cebadores RD9 (20 µM)	0.7 × 3
Cebadores RD12 (20 µM)	0.4 × 3
Cebadores RD4 (20 µM)	0.4 × 3
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0
ADN muestra	4.1
Volumen final	25 µL

**Cuadro S4.** Perfil de termociclado utilizado para la PCR múltiple

Etapa	Paso	Condición	Ciclos
<b>Inicial</b>	Desnaturalización	95 °C por 15 min	1
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	94 °C por 1 min	45
	Alineamiento	62 °C por 1 min	
	Extensión	72 °C por 1 min	
<b>Final</b>	Extensión final	72 °C por 10 min	1

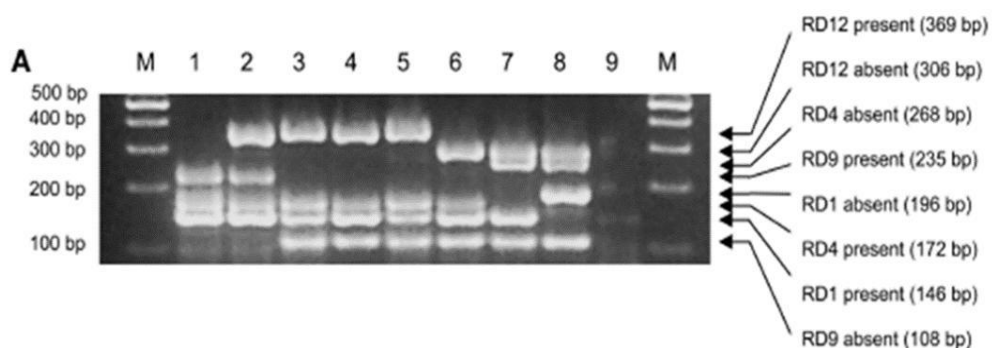


Figura S2. Electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa al 3%. Carril 2: *M. tuberculosis*, carril 7: *M. bovis* y Carril 8: *M. bovis* BCG. Tomado y modificado de Warren et al. (2006).

## PCR Dúplex tiempo Real

**Cuadro S5.** Secuencias específicas de sondas y cebadores (Forward y Reverse) para PCR a Tiempo Real con sondas TaqMan para confirmación de *M. bovis*.

Locus3_F (primer)	ATCAGCAGCGATGTGAGCAT	
Locus3_R (primer)	GACGGCTACCGGCAAGAC	<b>M. bovis USDA</b>
Locus3_P (Sonda)	FAM-CGGATGATTGCCAGCGGTTTGC-MGB-NFQ	<b>110 pb</b>
IS1081_1F1 (primer)	GGCTGCTCTCGACGTTTCATC	
IS1081_1R1 (primer)	CGCTGATTGGACCGCTCAT	<b>MTBC USDA</b>
IS1081_1P1 (Sonda)	VIC-CTGAAGCCGACGCCCTGTGC-MGB-NFQ	<b>100 pb</b>

**Cuadro S6.** Reactivos y volúmenes para la mezcla de reacción de PCR dúplex en tiempo real para confirmación de *M. bovis*

Reactivo	Volumen
Master Mix TaqMan Universal (2X) Thermo Scientific	10 µL
Primers F	0.5 µL / 20 µM
Primers R	0.5 µL / 20 µM
Sonda TaqMan	1 µL (10 µL)
Muestra ADN	5 µL
Agua grado Molecular	1 µL
Volumen final de la reacción	20 µL

Nota: Si se desea la reacción se puede ajustar únicamente al uso de la sonda L3. Debe seleccionarse Rox como colorante pasivo de referencia en la programación del equipo.

## TaqMan 2X universal PCR Master Mix

**Cuadro S7.** Perfil de ciclado para las reacciones de PCR dúplex en tiempo real para la confirmación de *M. bovis*

Etapas	Paso	Temperatura y duración	Cantidad de Ciclos
Primera	Pre-calentamiento	50 °C, 2 min	1
Segunda	Desnaturalización	95 °C, 10 min	1
Tercera	Desnaturalización	95 °C, 15 s	40
	Alineamiento	(60) °C, 1 min	

Nota: en la etapa de alineamiento se enciende la adquisición de la señal según el fluorocromo de cada sonda.

## Artículo 2.

### **Patrones de espigotipos y relaciones genéticas en aislamientos de *Mycobacterium bovis* con genoma completo en Costa Rica: implicaciones para la vigilancia epidemiológica**

#### **Resumen**

Los miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), incluido *Mycobacterium bovis*, conforman un grupo clonal con alta similitud genómica y diferenciación basada principalmente en deleciones. *M. bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina, una enfermedad zoonótica relevante por su impacto sanitario, económico y en salud pública, especialmente en regiones donde persisten prácticas como el consumo de productos lácteos no pasteurizados. La estructura poblacional de *M. bovis* es heterogénea y se organiza en complejos clonales cuya distribución refleja movimientos históricos de ganado. Identificar esta diversidad es esencial para fortalecer la vigilancia epidemiológica y evaluar programas de control.

Métodos tradicionales como el espigotipado y MIRU-VNTR han sido ampliamente utilizados por su bajo costo y reproducibilidad, permitiendo describir patrones de transmisión y linajes predominantes. Sin embargo, tienen capacidad limitada para resolver cadenas de transmisión recientes debido a la baja variabilidad genética y a la homoplasia por pérdida convergente de espaciadores. La secuenciación del genoma completo (WGS) ha emergido como una herramienta de mayor resolución, capaz de detectar microevolución, redefinir clústeres e inferir dinámicas de transmisión en escenarios endémicos.

En este estudio se analizaron 57 genomas de *M. bovis*, identificándose principalmente el espigotipo SB2020, acompañado de SB1041, SB1040 y un nuevo patrón (SB2844). El análisis con MERCAT y MIRU-VNTRplus mostró una estructura poblacional dominada por SB2020, con variantes cercanas que sugieren microevolución local, y un aislamiento humano (SB1040) distante, compatible con una introducción independiente. Los resultados confirman baja diversidad genética y

subrayan la necesidad de integrar métodos tradicionales con WGS para fortalecer la vigilancia molecular de la tuberculosis bovina y comprender la dinámica de transmisión en contextos locales.

## **Abstract**

Members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), including *Mycobacterium bovis*, form a clonal group with high genomic similarity and differentiation based primarily on deletions. *M. bovis* is the causative agent of bovine tuberculosis, a relevant zoonotic disease due to its health, economic, and public health impacts, especially in regions where practices such as the consumption of unpasteurized dairy products persist. The population structure of *M. bovis* is heterogeneous and organized into clonal complexes whose distribution reflects historical cattle movements. Identifying this diversity is essential to strengthen epidemiological surveillance and evaluate control programs.

Traditional methods such as spoligotyping and MIRU-VNTR have been widely used due to their low cost and reproducibility, allowing for the description of transmission patterns and predominant lineages. However, they have limited capacity to explain recent transmission chains due to the low genetic variability and homoplasmy resulting from convergent loss of spacers. Whole genome sequencing (WGS) has emerged as a higher-resolution tool, capable of detecting microevolution, redefining clusters, and inferring transmission dynamics in endemic settings.

In this study, 57 *M. bovis* genomes were analyzed, primarily identifying the spoligotype SB2020, accompanied by SB1041, SB1040, and a novel pattern (SB2844). Analysis with MERCAT and MIRU-VNTRplus revealed a population structure dominated by SB2020, with closely related variants suggesting local microevolution, and a distant human isolate (SB1040), consistent with independent introduction. The results confirm low genetic diversity and underscore the need to integrate traditional methods with WGS to strengthen molecular surveillance of bovine tuberculosis and understand transmission dynamics in local contexts.

**Palabras clave:**

Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, Spoligotyping, Espoligoforest, Epidemiología molecular

**1. Introducción**

Los miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) evolucionaron a partir de un ancestro común reciente que se asemejan a cepas actuales de *M. canettii*, conformando un grupo de especies clonales con alta similitud genómica y diferenciación principalmente por eventos de delección (Yenew et al., 2023). Dentro de este complejo, *Mycobacterium bovis* es el principal agente etiológico de la tuberculosis bovina (bTB), una enfermedad zoonótica de impacto sanitario, económico y productivo con riesgo a la salud pública por exposición ocupacional y especialmente en regiones donde persisten prácticas como consumo de productos lácteos no pasteurizados (Aranaz et al., 2004; OIE, 2021).

La estructura poblacional de *M. bovis* ha sido descrita como heterogénea, organizada en complejos clonales definidos (Eu1, Eu2, Af1 y Af2) cuya distribución geográfica refleja la historia de movimientos de ganado y rutas de transmisión entre países y continentes (Smith, 2012; Smith et al., 2011). Comprender esta diversidad es fundamental para mejorar estrategias de vigilancia, pues la identificación de clústeres predominantes permite rastrear fuentes de infección y evaluar la efectividad de los programas de erradicación (Brites et al., 2018).

Históricamente, el espoligotipado y el MIRU-VNTR se han establecido como métodos de referencia para caracterizar la diversidad de *M. bovis* debido a su bajo costo, reproducibilidad y capacidad complementaria de discriminación (Scaltriti et al., 2024; Ordaz-Vázquez et al., 2022). El espoligotipado ha sido utilizado para definir clados predominantes y describir patrones de transmisión en brotes, así como para describir la distribución de linajes a gran escala (Koro et al., 2015); se utiliza con frecuencia para caracterizar los patrones de transmisión de enfermedades infecciosas (Aandahl et al.,

2020), y ha sido considerada por algunos autores como un “estándar de oro” en estudios epidemiológicos (Perea Razo et al., 2018). Sin embargo, su uso rutinario aún es limitado en varias regiones, pese a ser recomendado para el análisis rápido de la estructura poblacional de *M. bovis* (Gomez-Buendia et al., 2021). No obstante, se reconoce que su resolución es limitada ante contextos de baja variabilidad genética, lo cual puede dificultar la detección de cadenas de transmisión recientes (Rodríguez-Campos et al., 2013).

En los últimos años, la secuenciación del genoma completo (WGS) ha emergido como una herramienta de mayor poder discriminatorio, detectando cambios puntuales conocidos como SNPs que permiten ver microevolución y mejorar la trazabilidad epidemiológica en escenarios endémicos (Price-Carter et al., 2018; Valcheva et al., 2022). Su incorporación progresiva ha permitido redefinir clústeres, inferir movimientos entre rebaños y fortalecer el enfoque de una sola salud en la vigilancia de esta enfermedad.

Por tanto, la integración de técnicas moleculares tradicionales con aproximaciones genómicas avanzadas es esencial para comprender con mayor precisión la estructura poblacional de *M. bovis* y orientar estrategias efectivas de control y erradicación, especialmente en países donde la enfermedad continúa circulando de forma activa.

## **Objetivo**

Determinar los patrones de espoligotipos en los aislamientos de *M. bovis* con genoma completo, así como posibles relaciones genéticas entre estos para la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Obtención de espoligotipos *in silico* a partir de secuenciaciones de *Mycobacterium bovis***

Las secuencias crudas (archivos FASTQ) obtenidas de los aislamientos de *Mycobacterium bovis* fueron analizadas mediante el software vSNP (USDA). En primer lugar, se evaluó la calidad de las lecturas generadas, excluyéndose aquellas que no alcanzaran una profundidad mínima de cobertura de 50X o que no presentaran la longitud esperada de 250 pares de bases (pb). Asimismo, se verificó la presencia de ambos pares de lectura (forward 5'-3' y reverse 3'-5') y se realizó el recorte de adaptadores para eliminar secuencias de baja calidad o artefactos técnicos.

Posteriormente, las lecturas filtradas se alinearon contra el genoma de referencia *M. bovis* AF2122/97 mediante el algoritmo BWA-MEM (Burrows-Wheeler Aligner). A partir del alineamiento resultante, se aplicó la función "spoligo" integrada en vSNP para la determinación de los patrones de espoligotipos *in silico*. Esta herramienta permite identificar las secuencias que corresponden a las regiones espaciadoras del locus de repetidos directos (locus DR) y calcular el número total de lecturas coincidentes, generando así el perfil de espoligotipos característico de cada aislamiento. Se requiere un mínimo de 5X para confirmar la presencia de un espaciador. Como resultado del análisis se obtiene una hoja de cálculo de Excel (.xlsx) con el número de lecturas por cada espaciador y el código binario correspondiente.

## **2.2 Determinación de relaciones genéticas entre espoligotipos de *M. bovis* mediante generación de árboles filogenéticos y/o redes genéticas de interacción utilizando herramientas informáticas como MERCAT Y MIRU-VNTR Plus.**

Para determinar las relaciones genéticas, se parte de la premisa que la evolución de un patrón de espoligotipo se da por la pérdida de un espaciador, el cual no puede ser restaurado por recombinación, y por ende se fija en la población. Es decir, el parentesco se da por la cantidad de espaciadores faltantes con respecto a un ancestro hipotético.

## **MERCAT (Molecular Epidemiology Researcher's Collection of Analytical Tools)**

(Aandahl et al., 2020):

Este programa de código abierto genera visualización interactiva tipo red (network plot), conocida como *Espoligoforests* y *Árbol de Mínima Expansión* (*phylogenetic tree*), que son gráficas de tipo red, que representa las relaciones entre espoligotipos, y utiliza como entrada un marco de datos (hoja de cálculo con el conjunto de códigos binarios, y su espoligotipo correspondiente).

Para este análisis se requirió de la instalación de los programas R y RStudio y del programa de código abierto MERCAT dentro de RStudio de acuerdo con las instrucciones del repositorio GitHub (<https://github.com/zaandahl/mercat>). Para ello fue necesario preparar el archivo de entrada SMEF a partir de los datos en la hoja de Excel obtenidos del análisis *in silico* de las secuenciaciones genómicas, y al ejecutar el programa se obtuvieron las figuras de Espoligoforest y de Árbol de mínima Expansión, así como gráfica de resumen de los perfiles SB encontrados.

La interpretación de las figuras obtenidas se realizó de acuerdo a lo descrito según Aandahl y colaboradores (2020), donde cada nodo representa perfiles y el tamaño de estos nodos la frecuencia o número de aislamientos. Los colores agrupan por clúster, especie o resistencia y las líneas conectan aislamientos con alta similitud genética. El algoritmo del espoligoforest en MERCAT se basa en un modelo de pérdida unidireccional de espaciadores y utiliza un árbol dirigido acíclico (DAG) que aplica un criterio de parsimonia (mínimas pérdidas) para inferir las relaciones evolutivas entre los espoligotipos.

## **MIRU-VNTR Plus**

MIRU-VNTR Plus es un servidor web (<https://miru-vntrplus.org/>) con colección de datos de genotipado de cepas de que representan los principales linajes de MTBC. Para análisis con esta plataforma utilizando Árbol de Expansión mínima (*minimum*

*spanning tree*, MST) se utilizó como entrada los datos del conjunto de códigos binarios, y su espoligotipo correspondiente obtenidas *in silico*. Se construyó una matriz binaria (muestras x 43 espaciadores) y se calculó la distancia de Hamming (número de espaciadores diferentes) entre cada par de perfiles. A partir de esta matriz de distancias se generó un Minimum Spanning Tree (MST) empleando el algoritmo de Kruskal/Prim (implementado en el software MIRU-VNTRplus/algoritmo interno), definiendo como SLV a las conexiones con diferencia de 1 espaciador. La interpretación de estos resultados se realizó según la resolución limitada de este análisis.

### 3. Resultados

#### 3.1 Patrones de espoligotipos

Se analizaron *in silico* un total de 57 secuencias de genoma completo de aislamientos de *M. bovis* dentro del periodo de estudio, más dos genomas obtenidos de aislamiento humano. Se obtuvieron los códigos binarios de espoligotipos y al comparar con la base de datos Mbovis.org se observó coincidencia con tres patrones SB conocidos: 44 patrones de SB2020, 1 SB1040 (Caso Humano facilitado por el INCIENSA), 11 SB1041 y uno sin coincidencia (no reportado) en dicha base (código binario 11011111010000000111111111001111111100000).

**Cuadro 1.** Caracterización de los aislamientos de *Mycobacterium bovis* mediante spoligotyping, con detalle del número de aislamientos por patrón SB, el huésped de origen y el tipo de muestra analizada.

Número SB	Cantidad de aislamientos	Huésped	Tipo de muestra
SB2020	44	Bovinos	Linfonodo
SB1041	11	Bovino	Linfonodo
SB1040	1	Caso Humano	Lavado Bronquial
No se encontró	1	Bovino	Linfonodo

Con respecto a la procedencia de estos aislamientos se reporta lo siguiente: Para los 40 aislamientos con el patrón SB2020 en la provincia de Alajuela un total de 20, para los cantones de San Carlos (16), Alajuela (1), Zarcero (2) y Naranjo (1); 14 para la provincia de San José (9 cantón de Goicochea y 5 Coronado). En el caso de los 6 para la provincia de Heredia (5 del cantón de Sarapiquí y 1 de distrito Varablanca), en la provincia de Cartago: 1 para el cantón de Cartago y 1 para el cantón de Siquirres en la provincia de Limón.

Para el patrón SB1041, el total de los 11 aislamientos presentaron la siguiente procedencia: 5 aislamientos fueron del cantón de San Carlos de la provincia de Alajuela, incluyendo un caso humano, 5 de la provincia de San José en los cantones de Coronado (2) Goicochea (3), y 1 de Horquetas de Sarapiquí de Heredia.

De todos los aislamientos analizados 2 correspondían a aislamientos de origen humano, de estos, 1 de muestra de lavado bronquial, presentó el patrón SB1041 procedente de cantón de San Carlos de la provincia de Alajuela; y el otro, el único encontrado con el patrón SB1040, del cantón de Goicochea San José. La procedencia geográfica del aislamiento con el patrón desconocido fue del cantón Zarcero en la provincia de Alajuela, aislado durante el año 2020 de linfonodo bovino. Dado que el patrón desconocido no se había reportado en Mbovis.org a enero del 2025, se procedió a solicitar el registro para este patrón obtenido de un aislamiento de Costa Rica (cabe mencionar que esta base de datos permite la inclusión únicamente de nuevos patrones, no la documentación de patrones presentes en total), por lo que se otorgó el número SB2844. La figura 1, resume la nomenclatura de espoligotipos encontrados y la figura 2, muestra la vista de la incorporación del SB2844 en la base de datos.





Espoligo	Patrón y Código Binario	Código Octal	Código Hexadecimal
SB2020	 11011111010100000111111111001111111100000	676501777177600	6F-54-0F-7E-7F-60
SB1041	 1101111 1010100 00011111111100111111 1100000	676501777177600	68-54-0F-7E-7F-60
SB1040	 110100000000001011011111111111111100000	640013377777600	68-00-5B-7F-FF-60
SB2844 CR	 11011111010000000111111111001111111100000	676501777177600	6F-50-0F-7E-7F-60

Figura 11. Patrones de espoligotipos identificados en los aislamientos de *Mycobacterium bovis*, mostrando la representación gráfica del patrón, su equivalente en código binario, y los códigos octal y hexadecimal asociados.



Figura 12. Determinación de relaciones genéticas entre espoligotipos de *M. bovis* con MERCAT Y MIRU-VNTR Plus.

## 3.2 MERCAT

### *Espoligoforest*

El análisis de los perfiles de espoligotipos de *Mycobacterium bovis* mediante la herramienta MERCAT permitió identificar cuatro patrones distintos: 1: SB2020 (n = 44), 2: SB1041 (n = 11), 3: SB1040 (n = 1) y 4: SB2844 (n = 1). La representación en Espoligoforest evidenció que el patrón SB2020 constituye el genotipo predominante, representado por el nodo de mayor tamaño (n = 44), siendo el nodo central, posiblemente el ancestral, del cual derivan los demás perfiles por pérdida progresiva de espaciadores específicos. El genotipo SB1041 (n = 11) se agrupó próximo al SB2020, y la conexión directa con este sugiere que podría haber surgido desde SB2020 (por pérdida progresiva de espaciadores en la región DR, compatible con un proceso evolutivo derivado), de la misma manera se observa el patrón para el espoligotipo SB2844 (n=1) que mostró una alta similitud con SB2020, diferenciándose únicamente en un espaciador (el nodo 4 recibe la flecha desde el nodo 1) indicando que SB2844 es una variante muy cercana a SB2020 y probablemente derivada de éste. La representación gráfica sitúa cercano al SB2020 el perfil SB1040, debido a la similitud en cantidad de espaciadores presentes (debido al algoritmo) infiriendo cercanía evolutiva que debe ser interpretada con cuidado, pues en este caso se conoce que el perfil corresponde a un caso humano probablemente importado y confirmado por NGS con mayor divergencia evolutiva y linaje distinto a los aislamientos de bovinos de Costa Rica.

### *Árbol Mínima Expansión o Minimum Spanning Tree (MST)*

El MST corroboró las observaciones, mostrando una estructura compacta con un nodo principal (1) correspondiente al espoligotipo SB2020, conectado directamente con los genotipos SB1041 (2) y SB2844 (1) por una sola diferencia en el patrón de espaciadores, reflejando alta similitud genética. El genotipo SB1040 (1) se ubica más alejado, separado por cuatro diferencias genéticas, lo que sugiere una menor

relación con el clúster principal. En conjunto, ambos análisis indican una baja diversidad genética dentro de los aislamientos estudiados y la presencia de un clon dominante asociado al espoligotipo SB2020, variantes estrechamente relacionadas, junto con una cepa más divergente (figura 3).

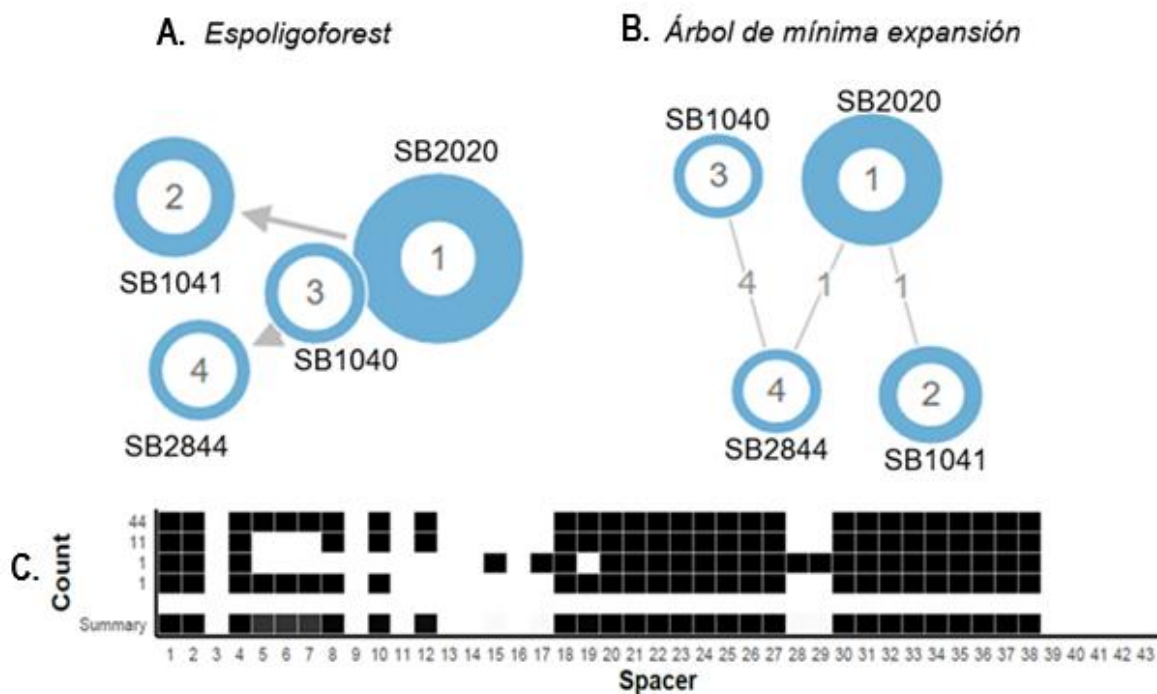


Figura 13. Análisis de relaciones genéticas entre espoligotipos de *Mycobacterium bovis*. (A) **Espoligoforest** generado a partir de los perfiles de espoligotipado, donde los círculos representan espoligotipos (SB2020, SB1041, SB1040 y SB2844) y su tamaño es proporcional al número de aislamientos. Las flechas indican las posibles transiciones evolutivas entre perfiles basadas en la pérdida secuencial de espaciadores. (B) **Árbol de mínima expansión** que muestra la distancia mínima entre espoligotipos según el número de diferencias en sus patrones de espaciadores. (C) **Resumen de patrones de espoligotipado**, donde cada columna corresponde a un espaciador (1-43) y la presencia o ausencia se representa en negro o blanco, respectivamente. Este panel ilustra las variaciones que sustentan la agrupación observada en los análisis anteriores.

El predominio del espoligotipo SB2020 concuerda con reportes previos en diversas regiones de América Latina, donde este patrón se asocia con circuitos endémicos de transmisión en bovinos y ocasionalmente con casos zoonóticos en humanos. La posición central del SB2020 (44 aislamientos) en el Espoligoforest y en el MST sugiere que este genotipo podría actuar como un linaje ancestral o de referencia

local, y la aparición más frecuente sugiere un clúster epidemiológico dominante, foco endémico o una transmisión sostenida localmente en las explotaciones ganaderas a partir del cual emergen variantes derivadas por pérdida de espaciadores, mecanismo común en la evolución de *M. bovis* (SB1041 Y SB2844).

El espoligoforest se basa en el principio de pérdida progresiva de espaciadores en la región DR. La escasa distancia genética observada entre los aislamientos (una a cuatro diferencias) refuerza la hipótesis de transmisión reciente o continua dentro de una misma población bovina, con posible circulación mantenida entre hatos o regiones geográficamente próximas.

El aislamiento único del espoligotipo SB2844, filogenéticamente relacionado a SB2020, podría reforzar la hipótesis de una evolución clonal reciente, caracterizada por modificaciones mínimas en el patrón de espaciadores, un fenómeno característico en la dinámica genética de *M. bovis*. Sin embargo, se requiere de más aislamientos con este perfil para sostener esta hipótesis. Por otro lado, la aparición de perfil SB1040 representado por un único caso de aislamiento humano sugiere una rama evolutiva paralela, posiblemente originada a partir de un ancestro común distinto al de SB2020, lo que podría reflejar una introducción independiente dentro de los aislamientos estudiados. Para este caso, la información clínica que se conoce es que el caso humano diagnosticado por el INCIENSA de Costa Rica, tenía historial de permanencia en el extranjero.

En el espoligoforest, el perfil SB1040 aparece conectado a SB2020, pero esta relación debe considerarse artefactual, pues el algoritmo de MERCAT lo enlaza por compartir un número mínimo de espaciadores, no obstante, los datos genéticos (NGS) y la clasificación por linajes (*M. bovis*-04 vs. *M. bovis*-07) sustentan que pertenecen a grupos evolutivos distintos. Por tanto, la conexión visual refleja solo parentesco binario no evolutivo. El espoligoforest no es un árbol filogenético real, sino una representación dirigida (grafo) que intenta minimizar las diferencias entre patrones binarios (presencia/ausencia de espaciadores). Estos resultados subrayan

la utilidad del análisis combinado de Espoligoforest y MST para la comprensión de la estructura poblacional de *M. bovis*, en conjunto con información relevante de cada caso como origen geográfico, clínica, entre otros para la vigilancia molecular de la tuberculosis bovina, permitiendo identificar genotipos dominantes y rastrear rutas potenciales de transmisión en programas de control epidemiológico.

### **MIRU-VNTR Plus**

El árbol de expansión mínima (MST): El análisis del MST basado en perfiles de espoligotipo (43 espaciadores) mostró un predominio del patrón SB2020, que formó el nodo central del complejo principal (Complex 1). Un espoligotipo estrechamente relacionado, SB2844, quedó conectado por una diferencia de un espaciador (SLV = 1), sugiriendo microevolución reciente o derivación de un ancestro común cercano. Otros nodos mostraron diferencias intermedias (p. ej. 3 espaciadores), mientras que SB1040 se ubicó fuera del complejo principal con una diferencia mayor (8 espaciadores), indicando un linaje más distante. Aunque el MST lo une, la distancia genética sugiere que no es parte del mismo grupo de transmisión reciente. En resumen: hay un clúster dominante (Complex 1: *M. bovis*-07/07A) con variantes cercanas (SLV=1, SLV=3) y al menos una rama claramente distante (SB1040, d=8).

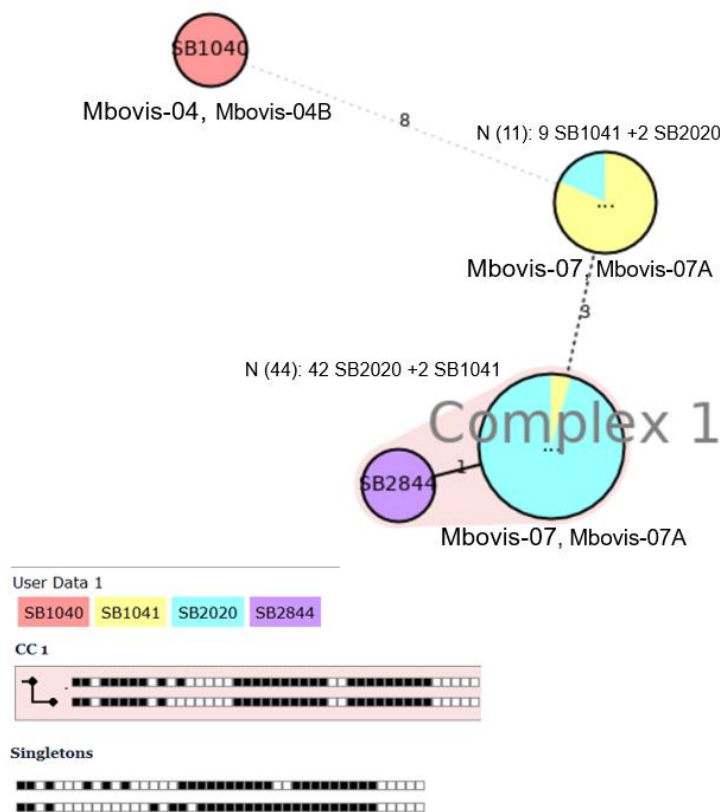


Figura 14. MST espoligotipos de 43 espaciadores. Cada nodo representa un conjunto de muestras con perfiles idénticos. Los sectores de color dentro de cada nodo indican la proporción de Espoligotipos (SB). Los números en las aristas indican el número de diferencias en espaciadores (Hamming distance) entre los perfiles conectados; una arista con valor 1 indica una variante de un solo espaciador (SLV) y valores mayores indican mayor distancia genética. Las líneas punteadas representan enlaces con distancias superiores y menor probabilidad de relación por transmisión reciente. "Complex 1" marca el clúster principal dominado por SB2020. Nota: el MST fue construido exclusivamente con la matriz de espoligotipos y se integró etiquetado de linajes según análisis de SNP por WGS.

#### 4. Discusión

Los avances en secuenciación del genoma completo (WGS) han permitido estudiar poblaciones microbianas con mayor resolución, proporcionando información detallada sobre la evolución, transmisión y relaciones filogenéticas del patógeno (Pozo et al., 2022). Actualmente, WGS es una herramienta ampliamente utilizada para comprender la estructura del MTBC a nivel global, habiendo permitido la clasificación de *M. tuberculosis* en ocho linajes, con *M. tuberculosis* representando L1 a L4 y L7-L8,

y *Mycobacterium africanum* comprendiendo L5 y L6; y la caracterización de *M. bovis* mediante complejos clonales definidos por deleciones genómicas, SNPs específicos y patrones de espoligotipos (Yruea et al., 2016). Estas tecnologías constituyen un recurso esencial para la vigilancia epidemiológica moderna, especialmente en escenarios donde los perfiles tradicionales de Spoligo-VNTR son frecuentes o poco discriminativos (Scaltriti et al., 2024).

El predominio de SB2020 y la presencia de variantes con 1 diferencia de región espaciadora (SB2844) son compatibles con la circulación de un linaje dominante con microvariantes locales. El nodo grande y mayoritariamente compuesto por SB2020 sugiere que este patrón de espoligotipo es dominante dentro del muestreo. Esto indica circulación extendida de ese patrón/linaje en la muestra estudiada. Variantes muy cercanas (SLV=1) presentan microevolución por pérdida/ganancia de espaciadores, y esto podría ser útil para relacionar casos (posible cadena de transmisión o derivación reciente).

No obstante, el espoligotipo de 43 espaciadores tiene resolución limitada para desentrañar cadenas de transmisión finas debido a la posibilidad de homoplasia, es decir, a linajes no relacionados que presentan espoligotipos idénticos por pérdida convergente de espaciadores; tal como lo menciona Sales et al. (2021) esto ocurre porque la pérdida de una región espaciadora en el locus de espoligotipificación es un evento común que puede ocurrir en cepas que no están filogenéticamente relacionadas. Por ello, para confirmar vínculos epidemiológicos y tiempos de divergencia se recomienda complementar con MIRU-24 y/o secuenciación genómica completa; ya que dicha técnica presenta las ventajas (de MIRU-VNTR): alto poder discriminatorio igual o incluso superior al de IS6110-RFLP, fiabilidad, alta reproducibilidad y asequibilidad del método (Ghavidel et al., 2018). La arista con "1" que conecta el nodo SB2844 al nodo más frecuente diferencia de un solo cambio en el patrón de espaciadores entre esos perfiles. Desde el punto de vista del espoligotipo, eso suele corresponder a la pérdida de un espaciador; por tanto, SB2844 podría ser una variante reciente derivada del linaje SB2020, y podría implicar

microevolución local o variabilidad intra-clonal. Epidemiológicamente esto podría ser compatible con relaciones recientes (misma cadena local o aparición reciente de una variante).

Una arista con 3 cambios indica divergencia mayor: podrían ser variantes relacionadas, pero con más eventos de pérdida de espaciadores, o linajes que se separaron hace más tiempo. En cuanto al Nodo distante (SB1040,  $d = 8$ ) claramente fuera del grupo principal de complejos espoligotipos; su presencia sugiere una introducción independiente o un linaje distinto que no está estrechamente relacionado con el clúster dominante. En cuanto a nodos mixtos, la inferencia de transmisión estricta a partir de espoligotipos es débil, la coexistencia de SB en nodos cercanos puede reflejar homoplasia por pérdida convergente de espaciadores. Por último, entre las limitaciones es importante tener en cuenta que la pérdida convergente de espaciadores es un proceso relativamente frecuente en el complejo *M. bovis*, por lo que patrones idénticos no garantizan relación epidemiológica directa. Con este análisis no se indica orden temporal ni tasas de mutación precisas; un cambio de “1 espaciador” puede representar un tiempo evolutivo variable.

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.

Los métodos tradicionales de tipificación, como el espoligotipado y MIRU-VNTR, presentan limitaciones importantes cuando se busca inferir relaciones filogenéticas o resolver cadenas de transmisión. Debido a su naturaleza homoplásica, patrones idénticos pueden surgir por evolución convergente y no necesariamente por descendencia común, lo que dificulta establecer relaciones epidemiológicas confiables (Sandhu et al., 2025). En particular, el espoligotipado posee un poder discriminatorio limitado porque analiza solo una región específica del genoma, y los

eventos de pérdida de espaciadores ocurren con menor frecuencia que otros tipos de mutaciones, como los SNPs (Sandhu et al., 2025). Por ello, aunque esta técnica no permite concluir que los espoligotipos representen clones o vínculos epidemiológicos recientes, sí ha demostrado ser útil para identificar relaciones genéticas distantes entre cepas y para describir la estructura poblacional en amplias escalas geográficas (Zumárraga et al., 2013).

La diversidad de espoligotipos reportada en América Latina refuerza estas consideraciones, al evidenciar tanto clados compartidos entre humanos y ganado como otros exclusivos de un país o de la población humana. En Argentina, México y Venezuela se han encontrado múltiples espoligotipos exclusivos de humanos, así como un porcentaje considerable de aislados humanos que comparten perfiles con el ganado, lo que sugiere posibles eventos de transmisión zoonótica (Zumárraga et al., 2013), como es el caso particular de un estudio de Sandoval-Azuara et al. (2017) realizado en México, en el cual se identificó el espoligotipo SB1040 aislado de humanos, coincidente con nuestros resultados. Se conoce que las diversas variantes del MTBC adaptadas a los humanos difieren en virulencia, en progresión de la enfermedad y en su potencial de transmisión. Por lo tanto, se supone que estas diferencias fenotípicas reflejan las distintas historias demográficas de sus respectivas poblaciones de hospederos humanos (Gómez-Velasco et al., 2023).

Este tipo de información contextualiza los patrones observados en distintos territorios y permite comparar la diversidad local con la reportada en otras regiones del continente. Los avances recientes en la caracterización de *M. bovis* también revelan que los complejos clonales clásicos no abarcan toda la diversidad genómica del patógeno. Se ha propuesto la existencia de un nuevo complejo clonal, “Europeo 3”, asociado principalmente al espoligotipo SB0120, lo que amplía el marco de referencia para interpretar la variabilidad observada en distintos países (Branger et al., 2020; Scaltriti et al., 2024). Este hallazgo resalta la necesidad de reconsiderar la clasificación poblacional de *M. bovis* a la luz de estudios con mayor resolución, como los basados en genomas completos.

En este sentido, la secuenciación del genoma completo (WGS) ofrece una resolución muy superior a los métodos tradicionales, permitiendo identificar SNPs, reconstruir relaciones evolutivas con mayor precisión y esclarecer vínculos epidemiológicos en escenarios en los que los perfiles de espoligotipo o MIRU-VNTR son frecuentes o poco discriminativos (Pozo et al., 2022; Scaltriti et al., 2024). El uso de WGS ha demostrado ser particularmente valioso en el análisis de brotes, la diferenciación fina de cepas y la comprensión de la dinámica de transmisión, lo que representa una mejora sustancial en la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina.

Finalmente, diversos estudios han sugerido que las diferencias observadas en la presentación clínica y evolución de la enfermedad en animales infectados podrían estar relacionadas con la cepa involucrada, caracterizada mediante DVR-espologotyping, MIRU-VNTR o WGS, así como con factores propios del hospedero (Gomez-Buendia et al., 2021). Estos elementos permiten interpretar los hallazgos genéticos en función de su posible impacto epidemiológico y clínico, enriqueciendo la discusión sobre la variabilidad observada y sus implicaciones para la vigilancia y el control de la tuberculosis bovina. Por otro lado, estudios como el de Tuzco y Köksal (2020) han permitido correlacionar casos zoonóticos a partir de patrones de espoligotipado y MIRUVNTR mostrando que aún siguen siendo técnicas útiles en casos de trazabilidad epidemiológica.

## **5. Conclusiones**

El espoligotipo SB2020 es el genotipo dominante en los aislamientos de *Mycobacterium bovis* analizados en Costa Rica, lo que sugiere un clúster epidemiológico persistente y de transmisión activa en el hato bovino. La baja diversidad genética observada indica circulación reciente y sostenida.

La detección del nuevo espoligotipo SB2844, estrechamente vinculado a SB2020, refuerza la hipótesis de microevolución local, derivada por pérdida progresiva de espaciadores en el locus DR.

El espoligotipo SB1040, identificado en un caso humano, no se agrupa filogenéticamente con el clúster predominante, sugiriendo introducción independiente o exposición fuera del país. Y la coincidencia de otro aislamiento humano con aislamientos bovinos confirma el potencial zoonótico y la necesidad de abordar la enfermedad bajo el enfoque de una sola salud.

El uso combinado de herramientas como MERCAT y MIRU-VNTR plus permitió corroborar relaciones genéticas y clústeres dominantes, aunque ambos métodos presentan limitaciones de resolución que requieren ser complementadas con genómica completa.

## Referencias

Aandahl, R. Z., Bhatia, S., Vaudagnotto, N., Street, A. G., Francis, A. R. y Tanaka, M. M. (2020). MERCAT: Visualising molecular epidemiology data combining genetic markers and drug resistance profiles. *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 104043. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104043>

Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A. I., Briones, V., Mateos, A. y Domínguez, L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6):2602–2608. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2602-2608.2004>

Branger, M., Loux, V., Cochard, T., Boschirolì, M. L., Biet, F. y Michelet, L. (2020). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* Mb3601, a SB0120 spoligotype strain representative of a new clonal group. *Infection, Genetics and Evolution*, 82,104309. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104309>.

Brites, D., Loiseau, C., Menardo, F., Borrell, S., Boniotti, M. B., Warren, R., Dippenaar, A., Parsons, S. D. C., Beisel, C., Behr, M. A., Fyfe, J. A., Coscolla, M. y Gagneux, S. (2018). A new phylogenetic framework for the animal-adapted

*Mycobacterium tuberculosis* complex. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2820. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820>

Ghavidel, M., Davood, Mansury., Nourian, K. y Ghazvini, K. (2018). The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. *Microbial Pathogenesis*, 118:310-315. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.036>.

Guimaraes, A. M. y Zimpel, C. K. (2020). *Mycobacterium bovis*: from genotyping to genome sequencing. *Microorganisms*, 8(5):667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>

Gomez-Buendia, A., Romero, B., Bezos, J., Lozano, F., de Juan, L. y Alvarez, J. (2021). Spoligotype-specific risk of finding lesions in tissues from cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *BMC Veterinary Research*, 17(1):148. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02848-3>

Gómez-Velasco, A., Molina-Torres, C. A., Vera-Cabrera, L., Bencomo-Alem, A., Muñoz-Jiménez, S. G., Sánchez-Pérez, H. J., Gordillo-Marroquín, C., Córdova-Solis, C. D., Enríquez-Ríos, N., Nuñez Ovilla, D. B., Sánchez-Oropeza, C., Nájera Ortiz, J. C. y Rodríguez Suárez, R. A. (2023). Diversidad genética del Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*: implicaciones clínicas y epidemiológicas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 26. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.563>

Koro, F., Ngatchou, A. F., Portal, J. L., Gutierrez, C., Etoa, F. X. y Eyangoh, S. I. (2015). The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(3):1001-1010. <https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2390>

Lorente-Leal, V., Pozo, P., Bezos, J., Collado, S., Vicente, J., Stuber, T., Álvarez, J., de Juan, L. y Romero, B. (2025). Revisiting *Mycobacterium bovis* SB0121 genetic

diversity reflects the complexity behind bovine tuberculosis persistence in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 239,106519. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2025.106519>.

Ordaz-Vázquez, A., Soberanis-Ramos, O., Cruz-Huerta, E., Retis-Sanchez-de-la-Barquera, S., Chávez-Mazari, B., Gudiño-Enriquez, T., Santacruz-Aguilar, M., Ponce-De-León-Garduño, A., Sifuentes-Osornio, J. y Bobadilla-Del-Valle, M. (2022). Genetic diversity of *Mycobacterium bovis* evaluated by spoligotyping and MIRU-VNTR in an intensive dairy cattle breeding area in Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3):1144-1154. <https://doi: 10.1111/tbed.14074>

Organización Mundial de Salud Animal. (2021). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). In *Terrestrial Animal Health Code 2021*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/3-04-06-bovine-tb-1.pdf>

Perea Razo, C. A., Rodríguez Hernández, E., Ponce, S. I. R., Milián Suazo, F., Robbe-Austerman, S., Stuber, T. y Cantó Alarcón, G. J. (2018). Molecular epidemiology of cattle tuberculosis in Mexico through whole-genome sequencing and spoligotyping. *PLoS ONE*, 13(8): e0201981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201981>

Price-Carter, M., Brauning, R., de Lisle, G. W., Livingstone, P., Neill, M., Sinclair, J., Paterson, B., Atkinson, G., Knowles, G., Crews, K., Crispell, J., Kao, R., Robbe-Austerman, S., Stuber, T., Parkhill, J., Wood, J., Harris, S. y Collins, D. M. (2018). Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 272. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00272>

Pozo, P., Lorente-Leal, V., Robbe-Austerman, S., Hicks, J., Stuber, T., Bezos, J., de Juan, L., Saenz, J. L., Romero, B., Alvarez, J. y Spanish Network on Surveillance Monitoring of Animal Tuberculosis. (2022). Use of whole-genome sequencing to unravel the genetic diversity of a prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype in a

multi-host scenario in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 13, 915843. [https://doi: 10.3389/fmicb.2022.915843](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.915843)

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. y 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):3658-65. [https://doi: 10.1128/JCM.01271-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01271-13).

Sales, É. B, Fonseca, A. A. Jr., Gonçalves, C. M., Lage, A. P., Andrade, G. I., Suffys, P. N., Gomes, H. M., Dias, N. L., Ferreira Neto, J. S., Guimarães, A. M. dS. y Heinemann, M. B. (2021). Multispacer Sequence Typing for *Mycobacterium bovis* Genotyping. *Front. Vet. Sci*, 8, 666283. [https://doi:10.3389/fvets.2021.666283](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.666283)

Sandhu, P., Nunez-Garcia, J., Berg, S., Wheeler, J., Dale, J., Upton, P., Gibbens, J., Hewinson, R. G., Downs, S. H., Ellis, R. J. y Palkopoulou, E. (2025). Análisis mejorado de la diversidad genómica de *Mycobacterium bovis* en Gran Bretaña para ayudar en el control de la tuberculosis bovina. *Microbiol frontal*, 16:1515906. [https://doi:10.3389/fmicb.2025.1515906](https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1515906).

Sandoval-Azuara, S. E., Muñoz-Salazar, R., Perea-Jacobo, R., Robbe-Austerman, S., Perera-Ortiz, A., López-Valencia, G., Bravo, D. M., Sanchez-Flores, A., Miranda-Guzmán, D., Flores-López, C. A., Zenteno-Cuevas, R., Laniado-Laborín, R., Lafarga de la Cruz, F. y Stuber, T. P. (2017). Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 63:48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.012>.

Santos, E. S., Alzamora Filho, F., Santos, B. R., Silva, A. V., Gomes, H. M., Suffys, P. N. y Costa, J. N. (2021). Spoligotyping, genotyping, and spatial distribution of *Mycobacterium bovis* in cattle in the state of Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 41, e06729. [https://doi:10.1590/1678-5150-PVB-6729](https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6729)

Scaltriti, E., Iyad, K., Boniotti, M. B., Menozzi, I., Bolzoni, L., Ippolito, D., Ciarello, F. P., Loda, D., D'Incau, M., Zanoni, M., Presti, V. D. M. L., Mazzone, P., Gavaudan, S. y Pacciarini, M. L. (2024). Dentro del espoligotipo *Mycobacterium bovis* SB0120 circulante en Italia: análisis de los genotipos más frecuentes mediante secuenciación del genoma completo. *Microbiol frontal*, 15, 1416605. [https://doi:10.3389/fmicb.2024.1416605](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1416605).

Smith, N. H. (2012). The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect. Genet. Evol.* 12, 857–865. [https://doi:10.1016/j.meegid.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.007)

Smith, N. H, Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., Romero, B., Matos, F., Ghebremichael, S., Karoui, C., Donati, C., da Conceicao Machado, A., Mucavele, C., Kazwala, R. R., Hilty, M., Cadmus, S., Ngandolo, B. N. R., Habtamu, M., Oloya, J., Muller, A.,... Kremer, K.. (2011). European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect Genet Evol*, 11:1340-51. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.027>

Tuzcu, N y Köksal, F. (2020). Evaluación genética de aislados de *Mycobacterium bovis* con MIRU-VNTR y espoligotipado. *Revista Turca de Ciencias Médicas*, 50(8): 2017-2023. <https://doi.org/10.3906/sag-1910-138>

Valcheva, V., Perea, C., Savova-Lalkovska, T., Dimitrova, A., Radulski, Ł., Mokrousov, I., Marinov, K., Najdenski, H. y Bonovska, M. (2022). *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Bulgaria: insight into transmission and phylogeography gained through whole-genome sequencing. *BMC Veterinary Research*, 18, 148. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03249-w>

Yenew, B., Ghodousi, A., Diriba, G., Tesfaye, E., Cabibbe, A. M., Amare, M., Moga, S., Alemu, A., Dagne, B., Sinshaw, W., Mollalign, H., Meaza, A., Tadesse, M., Gamtesa, D. F., Abebaw, Y., Seid, G., Zerihun, B., Getu, M., Chiacchiaretta, M., Gaudin, C., Marceau, M., Didelot, X., Tolera, G., Abdella, S., Kebede, A., Getahun, M., Mehammed,

Z., Supply, P. y Cirillo, D. M. (2023). A smooth tubercle bacillus from Ethiopia phylogenetically close to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nat Commun*, 14(1):7519. <https://doi:10.1038/s41467-023-42755-9>.

Yruela, I., Contreras-Moreira, B., Magalhães, C., Osório, N. S. y Gonzalo-Asensio, J. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* Complex Exhibits Lineage-Specific Variations Affecting Protein Ductility and Epitope Recognition. *Genome Biology and Evolution*, 8(12):3751–3764. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw279>

Zimpel, C. K., Patané, J. S. L., Guedes, A. C. P., de Souza, R. F., Silva-Pereira, T. T., Camargo, N. C. S., de Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Ferreira Neto, J. S., Setubal, J. C., Heinemann, M. B. y Guimaraes, A. M. S. (2020). Global distribution and evolution of *Mycobacterium bovis* lineages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 843. <https://doi:10.3389/fmicb.2020.00843>

Zumárraga, M. J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-Marín, L., de Waard, J., Estrada-García, I., Figueiredo, T., Figueroa, A., Giménez, F., Gomes, H. M., Gonzalez-y-Merchand, J. A., Macías, A., Milián-Suazo, F., Rodríguez, C. A. R., Santillán, M. A., Suffys, P.N., Trangoni, M. D., Zárraga, A. M. y Cataldi, A. (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 9–21. <https://doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.012>

## Discusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan evidencia relevante sobre la situación de la tuberculosis bovina en Costa Rica entre 2018 y 2021, integrando el análisis tradicional de cultivo con herramientas moleculares y genómicas. La recuperación de aislamientos mediante cultivo microbiológico mostró una variabilidad entre años, con porcentaje de positividad promedio cercano al 30%. El bajo porcentaje de recuperación y fluctuaciones en los años de análisis, puede deberse a la complejidad en la recuperación del agente infeccioso, la sensibilidad del medio de cultivo utilizado y el método, diferencias en las condiciones de toma de muestra, variaciones en la carga bacteriana, toma de la muestra o cambios en la intensidad de la vigilancia epidemiológica (Olea-Popelka et al. 2017). A pesar de sus limitaciones, el cultivo continúa siendo indispensable para la recuperación de aislamientos y la obtención de material genético para estudios de epidemiología molecular (Rodríguez-Campos et al. 2014).

La confirmación molecular mediante PCR múltiple y PCR a Tiempo Real permitió fortalecer la trazabilidad diagnóstica y garantizar que los aislamientos recuperados correspondieran efectivamente a *M. bovis*. Estas metodologías han demostrado, según lo reportado por Parsons et al. (2002), ser herramientas rápidas y precisas para identificar miembros del complejo *M. tuberculosis*. De igual forma, el uso de regiones de diferencia (RD) ha sido descrito como un enfoque robusto para distinguir linajes dentro del MTBC (Huard et al., 2003). Con respecto a ensayos de *qPCR*, se suma la elevada sensibilidad documentada para los ensayos dirigidos a blancos específicos, como el locus L3, capaces de detectar *M. bovis* incluso en muestras con baja carga bacteriana (Lorente-Leal et al., 2021). En conjunto, la implementación simultánea de estas dos metodologías complementarias incrementa la robustez analítica y reduce la probabilidad de falsos positivos o confusiones con otras especies del complejo.

Además, la secuenciación de genoma completo (WGS) aportó la resolución necesaria para caracterizar la variabilidad genética de los aislamientos y establecer relaciones

filogenéticas de mayor precisión, y permitió conocer la correspondencia a la clasificación de linaje clásico Europeo 1 y marcada homogeneidad genética entre los aislamientos provenientes de bovinos analizados (diferencias menores a 20 SNP). Además, las cepas analizadas de *Mycobacterium bovis* circulantes en Costa Rica presentaron baja diversidad genética, dominada por un único espoligotipo; el SB2020, del cual derivan variantes cercanas como SB1041 y SB2844. Este patrón coincide con lo reportado en regiones de América Latina donde ciertos genotipos se establecen como linajes endémicos y mantienen cadenas de transmisión sostenidas en el hato bovino (Brites et al., 2018). La identificación de un linaje dominante es coherente con la naturaleza clonal del MTBC y con la evolución basada en pérdida progresiva de espaciadores (Yenew et al., 2023).

El análisis mediante MERCAT y MIRU-VNTRplus mostró una estructura genética compacta, reflejada en diferencias de uno a pocos espaciadores entre los perfiles predominantes. Esta cercanía genética sugiere transmisión reciente o continua, posiblemente asociada a movilidad de animales entre fincas y regiones, un fenómeno ya descrito para los complejos clonales Eu1 y Eu2 a nivel global (Smith, 2012; Smith et al., 2011). La aparición del nuevo patrón SB2844 como variante muy cercana a SB2020 refuerza la hipótesis de microevolución local dentro de un linaje establecido.

Por otro lado, la detección del espoligotipo SB1040 en un único aislamiento humano; genéticamente distante ( $d=8$ ), apunta a una introducción independiente, más que a transmisión desde el linaje bovino dominante. Esto coincide con hallazgos en la región donde se han documentado perfiles humanos no asociados a los clados predominantes en ganado (Zumárraga et al., 2013). Su ubicación cercana a SB2020 en el espoligoforest resalta una limitación metodológica: la homoplasia, fenómeno bien documentado en estos marcadores (Sales et al., 2021).

Aunque el espoligotipado sigue siendo una herramienta útil para caracterizar estructuras poblacionales amplias (Koro et al., 2015; Perea Razo et al., 2018), sus limitaciones para inferir relaciones filogenéticas finas justifican el uso complementario

de métodos más resolutivos como la secuenciación del genoma completo (Pozo et al., 2022; Scaltriti et al., 2024). La baja discriminación observada refuerza la necesidad de integrar WGS de manera sistemática para confirmar vínculos epidemiológicos, identificar eventos zoonóticos y mejorar la trazabilidad de focos infecciosos (Ortiz et al., 2021).

Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la vigilancia activa en Costa Rica. La dominancia del SB2020 sugiere un clúster persistente que podría ser objeto de intervención prioritaria. Asimismo, la identificación de variantes derivadas ofrece oportunidades para explorar rutas de transmisión local y evaluar eficacia de medidas de control. En conjunto, los resultados apoyan la integración de métodos tradicionales con secuenciación de genoma completo para fortalecer estrategias de control, avance en posible erradicación y trabajar con enfoque de Una Sola Salud en tuberculosis bovina.

## Referencias

- Brites, D., Loiseau, C., Menardo, F., Borrell, S., Boniotti, M. B., Warren, R., Dippenaar, A., Parsons, S. D. C., Beisel, C., Behr, M. A., Fyfe, J. A., Coscolla, M. y Gagneux, S. (2018). A new phylogenetic framework for the animal-adapted *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2820. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820>
- Huard, R. C., de Oliveira Lazzarini, L. C., Ray Butler, W., van Soolingen, D. y Ho, J. L. (2003). PCR-based method to differentiate MTBC lineages using regions of difference. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3): 1488–1493. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.4.1637-1650.2003>
- Koro, F., Ngatchou, A. F., Portal, J. L., Gutierrez, C., Etoa, F. X. y Eyangoh, S. I. (2015). The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. *Revue Scientifique et*

*Technique (International Office of Epizootics)*, 34(3):1001-1010.  
<https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2390>

Lorente-Leal, V., Liandris, E., Pacciarini, M., Botelho, A., Kenny, K., Loyo, B., Fernández, R., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L. y Romero B. (2021). Direct PCR on tissue samples to detect *Mycobacterium tuberculosis* Complex: An Alternative to the Bacteriological Culture. *J Clin Microbiol*, 59(2): e01404-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01404-20>.

Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A. S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B. J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBlue, F. y Fujiwara, P. (2017). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* a call for action. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(1): e21- e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)

Ortiz, A. P., Perea, C., Dávalos, E., Velázquez, E. F., González, K. S., Camacho, E. R., García Latorre, E. A., Lara, C. S., Salazar, R. M., Bravo, D. M., Stuber, T. P., Thacker, T. C. y Robbe-Austerman, S. (2021). Whole genome sequencing links *Mycobacterium bovis* from cattle, cheese and humans in Baja California, Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 674307. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.674307>

Perea Razo, C. A., Rodríguez Hernández, E., Ponce, S. I. R., Milián Suazo, F., Robbe-Austerman, S., Stuber, T. y Cantó Alarcón, G. J. (2018). Molecular epidemiology of cattle tuberculosis in Mexico through whole-genome sequencing and spoligotyping. *PLoS ONE*, 13(8): e0201981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201981>

Parsons, L. M., Brosch, R., Cole, S. T., Somoskövi, Á., Loder, A., Bretzel, G., van Soolingen, D., Hale, Y. M. y Salfinger, M. (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7): 2339–2345. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2339-2345.2002>

Pozo, P., Lorente-Leal, V., Robbe-Austerman, S., Hicks, J., Stuber, T., Bezos, J., de Juan, L., Saenz, J. L., Romero, B., Alvarez, J. y Spanish Network on Surveillance Monitoring of Animal Tuberculosis. (2022). Use of whole-genome sequencing to unravel the genetic diversity of a prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype in a multi-host scenario in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 13, 915843. [https://doi: 10.3389/fmicb.2022.915843](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.915843)

Rodríguez-Campos, S., Smith, N. H., Boniotti, M. B. y Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(Suppl.): S5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>

Sales, É. B, Fonseca, A. A. Jr., Gonçalves, C. M., Lage, A. P., Andrade, G. I., Suffys, P. N., Gomes, H. M., Dias, N. L., Ferreira Neto, J. S., Guimarães, A. M. dS. y Heinemann, M. B. (2021). Multispacer Sequence Typing for *Mycobacterium bovis* Genotyping. *Front. Vet. Sci*, 8, 666283. [https://doi:10.3389/fvets.2021.666283](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.666283)

Scaltriti, E., Iyad, K., Boniotti, M. B., Menozzi, I., Bolzoni, L., Ippolito, D., Ciarello, F. P., Loda, D., D'Incau, M., Zanoni, M., Presti, V. D. M. L., Mazzone, P., Gavaudan, S. y Pacciarini, M. L. (2024). Dentro del espoligotipo *Mycobacterium bovis* SB0120 circulante en Italia: análisis de los genotipos más frecuentes mediante secuenciación del genoma completo. *Microbiol frontal*, 15, 1416605. [https://doi:10.3389/fmicb.2024.1416605](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1416605).

Smith, N. H. (2012). The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect. Genet. Evol.* 12, 857–865. [https://doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.007)

Smith, N. H, Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., Romero, B., Matos, F., Ghebremichael, S., Karoui, C., Donati, C., da Conceicao Machado, A., Mucavele, C., Kazwala, R. R., Hilty, M., Cadmus, S., Ngandolo, B. N. R., Habtamu, M., Oloya, J., Muller, A., Kremer, K. (2011). European 1: A globally important clonal complex of

*Mycobacterium bovis*. *Infect Genet Evol*, 11:1340-51.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.027>

Yenew, B., Ghodousi, A., Diriba, G., Tesfaye, E., Cabibbe, A. M., Amare, M., Moga, S., Alemu, A., Dagne, B., Sinshaw, W., Mollalign, H., Meaza, A., Tadesse, M., Gamtesa, D. F., Abebaw, Y., Seid, G., Zerihun, B., Getu, M., Chiacchiaretta, M., Gaudin, C., Marceau, M., Didelot, X., Tolera, G., Abdella, S., Kebede, A., Getahun, M., Mehammed, Z., Supply, P. y Cirillo, D. M. (2023). A smooth tubercle bacillus from Ethiopia phylogenetically close to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nat Commun*, 14(1):7519. <https://doi:10.1038/s41467-023-42755-9>.

Zumárraga, M. J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-Marín, L., de Waard, J., Estrada-Garcia, I., Figueiredo, T., Figueroa, A., Giménez, F., Gomes, H. M., Gonzalez-y-Merchand, J. A., Macías, A., Milián-Suazo, F., Rodríguez, C. A. R., Santillán, M. A., Suffys, P.N., Trangoni, M. D., Zárraga, A. M. y Cataldi, A. (2013). Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 9–21. <https://doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.012>

## **Conclusiones generales**

El análisis de cultivos realizados entre 2018 y 2021 confirma la circulación activa de *Mycobacterium bovis* en el hato bovino de Costa Rica, con afectación principal en fincas ubicadas en zonas de alta productividad pecuaria mayoritariamente en provincias de Alajuela y San José, lo que evidencia la persistencia de la enfermedad y la necesidad de mantener estrategias de vigilancia.

Las herramientas moleculares (PCR, secuenciación y análisis de espigotipado) fortalecen la capacidad diagnóstica nacional permitiendo confirmar con alta

especificidad la identidad y variabilidad genética del agente causal de la tuberculosis bovina, aportando información importante para la epidemiología de la enfermedad.

El análisis genómico de los aislamientos mediante WGS constituye una herramienta fundamental para apoyar el estudio epidemiológico y orientar acciones en el país, ya que proporciona mayor resolución para la trazabilidad epidemiológica y fortalece estrategias de prevención y control bajo el enfoque de una sola salud.

## **Recomendaciones generales**

Aumentar la sensibilidad del cultivo y lograr mayor porcentaje de recuperación de cepas de *M. bovis* utilizando medios de cultivo en paralelo como el sistema BD BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson) que permite la detección desde las primeras dos semanas y se ha documentado mayor sensibilidad con resultados desde 8-14 días.

Fortalecer la vigilancia en las regiones con mayor carga de enfermedad, priorizando controles sanitarios y estudios epidemiológicos dirigidos.

Ampliar la cobertura de secuenciación de aislamientos nacionales para caracterizar con mayor detalle la diversidad genética, en particular en regiones poco representadas con este estudio y su relación con fuentes de infección, reservorios y flujos de movilidad del ganado, así como para confirmar la distribución real del SB2020 y validar la circulación emergente del SB2844 en el país.

Promover la capacitación continua del personal técnico en mataderos, así como la optimización del proceso de muestreo y la capacitación del personal técnico y profesional en diagnóstico y personal para análisis en el área de bioinformática aplicada a tuberculosis bovina.

Construir redes de apoyo para análisis de datos complejos con requerimientos de alta capacidad computacional.

Priorizar la tipificación de casos humanos con antecedente de contacto con ganado o consumo de lácteos no pasteurizados, para fortalecer la trazabilidad zoonótica.

Crear una base de datos nacional integrada con perfiles moleculares y metadatos epidemiológicos que faciliten estudios comparativos regionales y alertas tempranas.