

Detección molecular de *Leptospira* spp. y *Mycobacterium* spp. en ganado bovino del municipio Los Palmitos, Sucre - Colombia



Molecular detection of *Leptospira* spp. and *Mycobacterium* spp. in cattle of Los Palmitos municipality, Sucre - Colombia

<https://eqrcode.co/a/jO1uDL>

 Lina Lineth Durán Cueto ^{1*}, Libardo Enrique Caraballo Blanco ²,
Pedro José Blanco Tuirán ³

¹Universidad de Sucre, Grupo Investigaciones Biomédicas, Sincelejo, Colombia.

²Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología, Grupo Investigaciones Biomédicas, Sincelejo, Colombia.

³Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología, Grupo Investigaciones Biomédicas. Sincelejo, Colombia.

RESUMEN: El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de *Leptospira* spp. y *Mycobacterium* spp. mediante técnicas moleculares, en ganado bovino del municipio Los Palmitos, Sucre-Colombia. Se estudiaron 172 muestras de sangre de individuos procedentes de 12 predios, las cuales se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con dos parejas de cebadores que amplifican una región del gen ARNr 16S de *Mycobacterium* spp. y la subunidad B de la ADN girasa de *Leptospira* spp. A partir de 35 muestras (20 %), se amplificó el segmento de interés del gen ARNr 16S y de ellas se enviaron 12 para definir su secuencia; solo ocho secuencias fueron informativas, de las cuales seis pertenecían a especies del género *Dietzia* y dos al género *Mycobacterium*. De las tres muestras positivas (1,7 %) a *Leptospira* spp., solo se recuperó una que mostró identidad con la especie *Leptospira interrogans*. Estos resultados permiten afirmar que el ganado bovino en rebaños de Los Palmitos, Sucre-Colombia, es portador de especies bacterianas que pueden generar un impacto negativo en la producción ganadera y son un riesgo para la salud humana.

Palabras clave: bovinos, *Leptospira* spp., *Mycobacterium* spp., *Dietzia*, ARNr 16S, PCR.

ABSTRACT: The objective of the present study was to detect the presence of *Leptospira* spp. and *Mycobacterium* spp. by means of molecular techniques in cattle of Los Palmitos municipality, Sucre-Colombia. One hundred seventy-two blood samples from individuals from 12 farms were studied. They were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) with two pairs of primers amplifying a region of the 16S rRNA gene of *Mycobacterium* spp. and other primers specific for *Leptospira* DNA gyrase subunit B (gyrB). The segment of interest of the 16S rRNA gene was amplified from 35 samples (20 %), of these, 12 were sent for sequencing. Only eight sequences were informative, of which six belonged to species of the genus *Dietzia* and two to the genus *Mycobacterium*. Of the three positive samples to *Leptospira* spp. (1.7 %), only one was recovered showing identity with the species *Leptospira interrogans*. These results allow to affirm that cattle in Los Palmitos, Sucre-Colombia, are carriers of bacterial species that can generate a negative impact on livestock production, being also a risk to human health.

Key words: cattle, *Leptospira* spp., *Mycobacterium* spp., *Dietzia*, 16S rRNA, PCR.

*Autor para la correspondencia: Lina Lineth Durán Cueto. E-mail: linaduran1994@gmail.com.

Recibido: 15/11/2019

Aceptado: 25/03/2020

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes enfermedades infecciosas que afectan a rumiantes y otras especies, de las cuales algunas son causadas por bacterias, entre las que se encuentran los géneros *Leptospira* y *Mycobacterium*. Estas enfermedades bacterianas ponen en peligro la salud del animal y la productividad ganadera (1). La leptospirosis es una zoonosis bacteriana distribuida a nivel mundial, con una mayor incidencia en las regiones tropicales y subtropicales, debido a que cuentan con las condiciones ambientales que favorecen la presencia de la enfermedad, especialmente en las temporadas de lluvias. Además, representa un problema, tanto epidemiológico como social y económico (2). El agente etiológico de la infección es una espiroqueta patógena del género *Leptospira* que pertenece a la familia *Leptospiraceae* y al orden *Spirochaetales* (3). Dentro del género *Leptospira*, las bacterias se clasifican en saprófitas y patógenas. La especie patógena más común es *Leptospira interrogans*, de la que actualmente se conocen 20 serogrupos y más de 250 serovariedades (4).

La infección es común en animales domésticos y silvestres, aunque en ocasiones, puede llegar a infectar al hombre. La leptospirosis puede ocurrir en animales domésticos como los perros y en los de granja, como los cerdos y las ovejas, por lo que es un riesgo para la salud pública, ya que, una vez infectados, eliminan la bacteria por medio de la orina al ambiente, actuando así como una fuente de infección (5). En el ganado bovino, la enfermedad se asocia principalmente con abortos, mortinatos, muertes, reducción en la producción de la leche, nacimientos de terneros débiles y, por último, infertilidad. Estos problemas generan grandes pérdidas económicas en los hatos ganaderos (6).

Por su parte, las bacterias del género *Mycobacterium*, clasificadas como bacilos aerobios acidorresistentes, no móviles, también comprenden especies saprófitas que habitan en suelos y medios acuáticos y patógenas que infectan a humanos y animales. Entre las especies de este género se encuentran las causales de la tuberculosis (7). Dentro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium*

tuberculosis complex, MTBC), se ubican las principales especies causantes de la tuberculosis humana y de mamíferos (*M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. pinnipedii*) (8). La Tuberculosis bovina (TBB), es una enfermedad crónica de distribución mundial, su prevalencia varía según la región o país. El ganado bovino es su reservorio principal y su agente etiológico es el bacilo *Mycobacterium bovis*, una bacteria que afecta a una amplia gama de animales domésticos y silvestres (9).

La tuberculosis tiene repercusiones económicas, debido a las pérdidas en la producción de leche, por la muerte del ganado y restricciones en la comercialización. Además, esta enfermedad posee un carácter zoonótico, por lo que resulta una preocupación fundamental en la salud pública (10). La tuberculosis bovina está asociada a la pérdida de apetito, debilidad, pérdida de peso, fiebre fluctuante, tos seca intermitente y linfonódulos grandes y prominentes (11).

En cuanto al diagnóstico, MAP y la leptospirosis tienen como prueba de oro el cultivo y la microaglutinación (MAT), respectivamente; sin embargo, en cuanto al cultivo, debido a la naturaleza de la micobacteria, resulta muy fastidioso por ser de crecimiento lento y la MAT tiene sus dificultades en la variación del título y las reacciones cruzadas, de ahí que el método de PCR muestre ventajas, como mayor rapidez en el diagnóstico y detección directa del microorganismo (12). El diagnóstico basado en PCR puede ser usado en una amplia variedad de matrices, como son leche, productos lácteos, carne, agua, orina, y muestras ambientales, así como de heces (13).

La ganadería es la principal actividad económica del departamento de Sucre, la cual representa 84,9 % del uso de su territorio (14). Los Palmitos, Sucre, se ubican en una zona que tiene las condiciones biológicas, ecológicas, agrícolas y ganaderas que facilitan la existencia de bacterias patógenas responsables de enfermedades infecciosas. Además, la información es escasa con respecto a las infecciones provocadas por los géneros *Mycobacterium* y *Leptospira* en el ganado bovino en el departamento de Sucre. Por lo que el

presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de *Leptospira* spp. y *Mycobacterium* spp. mediante técnicas moleculares, en ganado bovino del municipio Los Palmitos, Sucre-Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El municipio Los Palmitos se encuentra ubicado a los 9°22'52" de latitud norte y 75°16'17" de longitud oeste del departamento de Sucre-Colombia; cuenta con una altura de 175 m.s.n.m y su temperatura promedio anual es de 28°C. Los Palmitos tiene una extensión geográfica de 125 km², de los cuales 55 km² corresponden al área rural y los 70 km² restantes al área urbana (15).

Selección de las muestras

Se analizaron 172 muestras de sangre almacenadas a -20°C por un año en el banco de muestras del laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Las muestras se colectaron en 12 fincas ganaderas, con previo consentimiento informado por parte del propietario del ganado. Las muestras de sangre se tomaron de la vena yugular con una jeringa de 5 mL y se depositaron en tubos de Vacutainer® con el anticoagulante ácido etilendiamina tetraacético (EDTA). Clínicamente, al momento de la toma de muestras los animales gozaban de buena salud.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico total a partir del método de altas concentraciones de sales (16), con algunas modificaciones, como se describe a continuación. De cada muestra de sangre se tomaron 200 µL, a los cuales se les adicionaron dos volúmenes de solución tampón SAE (0,075M NaCl, 0,024M EDTA), se centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C. Seguidamente, el sobrenadante se descartó y se adicionaron 500 µL de buffer de lisis (TENS: 10 mM Tris-Cl pH. 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 % SDS, pH 7,5) al precipitado. Las muestras se sometieron a digestión enzimática con un volumen de 3 µL de proteinasa K (200 mg/mL),

por 2 horas a 55°C (activación enzimática) y se inactivó a 95 C por 1 minuto; luego, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial, al cual se le adicionó 300 µL de acetato de potasio 5M, mezclando por inversión en hielo durante 15 minutos. Nuevamente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante resultante se pasó a otro vial; se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con 1 mL de etanol a 70 %; se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y se descartó el etanol. Finalmente, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua ultra pura. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro Nanodrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific) para estimar la concentración de ácidos nucleicos y los niveles de contaminación con ARN y proteínas.

Detección de *Leptospira* spp. y *Mycobacterium* spp. por PCR

Para la amplificación de ADN de *Mycobacterium* spp. se usaron los cebadores KY específicos para un fragmento entre 565 y 590 pb de la región del gen ARNr 16S, KY18 (5'-CACATGCAAGTCGAACGGAAAGG-3') y KY75 (5'-GCCGTATCGCCCCGACGCTCACA-3') (17). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía: 1X buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,3 pmol de ambos cebadores, 1 U/µl de Taq ADN polimerasa, 3 µL de ADN y agua destilada para completar el volumen final. En cada reacción de PCR se usaron un control positivo aislado de una vaca positiva para MAP y uno negativo; para el control positivo se utilizó ADN de una especie de *Mycobacterium* aislada de un bovino en Antioquia y para el control negativo agua estéril. La reacción se incubó en un termociclador *Applied Biosystems Veriti 96-Well*. El perfil de amplificación térmica empezó con una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, alineación a 65°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos; se

finalizó con una extensión de 72°C por 10 minutos.

Los cebadores que se utilizaron para detectar la presencia de cepas patógenas de *Leptospira* fueron: 2For (5'-TGAGCCAAGAAGAAACAA GCTACA-3') y 504Rev (5'- MATGGTTCCRC TTTCCGA AGA-3') que amplifican una región de 502 pb en la subunidad B del gen que codifica para la ADN girasa. La amplificación por PCR se realizó en un volumen de 25 µL, bajo las siguientes condiciones: 1X buffer de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 pmol de ambos cebadores, 1 U/µL de Taq ADN polimerasa, 2 µL de ADN y agua destilada para completar el volumen final. Un control positivo y uno negativo se usaron en cada reacción de PCR; para el control positivo se utilizó ADN de *Leptospira interrogans* y para el control negativo agua estéril. La mezcla de reacción fue incubada en un termociclador Bio-rad bajo los parámetros descritos a continuación. Con un ciclo térmico de desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, alineación a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos y con una extensión final a 72°C durante 10 minutos (18).

Electroforesis en gel de agarosa y análisis de imágenes

Todos los productos amplificados por PCR obtenidos de la región del gen ARNr 16S y del marcador taxonómico *gyrB*, se sometieron a separación mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,8 % con previa tinción con GelStar®. Se tomaron 5 µL de cada producto y se mezclaron con 3 µL de solución tampón de carga Green y estos se depositaron en los pozos del gel. El corrido electroforético se estableció a 80 V durante 60 minutos. La fotodocumentación de los geles se realizó a través de un transiluminador QUANTUM-ST4 versión 15.18 para Windows copyright© 2004-2011 (VilberLourmat).

Los productos de PCR se consideraron como positivos cuando se presentaron amplicones del tamaño esperado para el gen de interés, utilizando como referentes los controles positivos de PCR (ADN de una especie *Mycobacterium* aislado de un bovino y ADN de un aislado de

Leptospira interrogans) y un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega™).

Purificación y secuenciación de los productos de PCR

De los productos positivos por PCR, se seleccionaron tres de *Leptospira* spp. y 12 de *Mycobacterium* spp. para los estudios posteriores, teniendo en cuenta la intensidad de la banda en el gel de agarosa y la concentración de ADN una vez purificado. La cantidad de ADN se cuantificó y se purificó con el kit de extracción rápida de gel PureLink®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se enviaron a secuenciar, en ambos sentidos de la cadena de nucleótidos, a la empresa MacroGenInc (Seúl, Corea del Sur); procedimiento que se realizó mediante el sistema de electroforesis capilar (analizador de ADN ABI 3730xl), basado en el método de terminación de cadena con dideoxynucleótidos marcados con diferentes grupos fluorescentes (19). En la reacción de secuenciación se usaron los cebadores descritos en la PCR original.

Análisis filogenético

Los electroforegramas obtenidos se editaron en el programa MEGA® versión 7.0 (20). Posteriormente, se revisaron de forma manual para obtener las secuencias consenso que se compararon con secuencias registradas en la base de datos GenBank, mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST) (21) y, teniendo en cuenta los criterios de identidad y cobertura, se seleccionaron las secuencias con mayor porcentaje de identidad respecto a las secuencias de interés.

Posteriormente, se determinó el modelo de evolución que mejor explica la relación filogenética entre las secuencias; resultó ser el modelo de Kimura-2 parámetros. Finalmente, se realizó la reconstrucción filogenética con el método de Neighbor-Joining (22-24).

RESULTADOS

De las 172 muestras analizadas por PCR, 35 fueron positivas para *Mycobacterium* spp.

(Fig. 1), pues evidenciaron productos de amplificación del tamaño esperado. De este resultado, 28,57 % (10/35) pertenece al mismo predio y 71,42 % (25/35) procedía de cinco fincas distintas de las 12 muestreadas. Con respecto a *Leptospira* spp., el 1,74 % (3/172) fue positiva y todas provenían de un mismo predio (Fig. 2). Además, solo en seis fincas de las 12 muestreadas (50 %) no se obtuvieron muestras positivas para las bacterias patógenas investigadas en este estudio. También, es importante resaltar que la finca con mayor positividad (10/35) para el género *Mycobacterium*, no fue la misma en la cual se detectaron muestras positivas para *Leptospiras* pp.

De las muestras positivas para *Mycobacterium* spp. por PCR, se enviaron 12 a secuenciar, y ocho secuencias permitieron hacer la confirmación de estas muestras (Fig. 3). Mientras, de las tres secuencias de las muestras positivas para *Leptospira* spp., solamente una se pudo recuperar, debido a que el tamaño de las otras dos secuencias no fueron informativas, lo cual se podría asociar a la calidad del ADN obtenido una vez que se realizó el proceso de purificación y secado de las muestras.

Los resultados en el árbol filogenético muestran la composición del clado de *Mycobacterium* spp., como se indica en el recuadro rojo y su relación con otro clado, donde algunas de las muestras se agruparon con el género *Dietzia* (cuadro azul) (Fig. 3). En la base de cada clado se muestra el soporte de rama, expresado como el porcentaje de veces en que el análisis produjo la misma asociación entre las secuencias analizadas. La barra de escala indica 0,10 sustituciones por posición de nucleótido.

Los triángulos azules indican las muestras correspondientes a este estudio; el cuadro verde indica el control positivo y los triángulos rojos hacen referencia a las especies con las que se relacionan las muestras.

Como era de esperar, teniendo en cuenta la especificidad de los cebadores para identificar hasta nivel de especie del género *Leptospira*, el análisis por BLAST de la secuencia obtenida permitió confirmar que se trataba de la especie *Leptospira interrogans*, al obtenerse una identidad de 100 % y cobertura de 99 % con secuencias registradas en la base de datos GenBank (número de acceso CP020414, CP022539, entre otros).

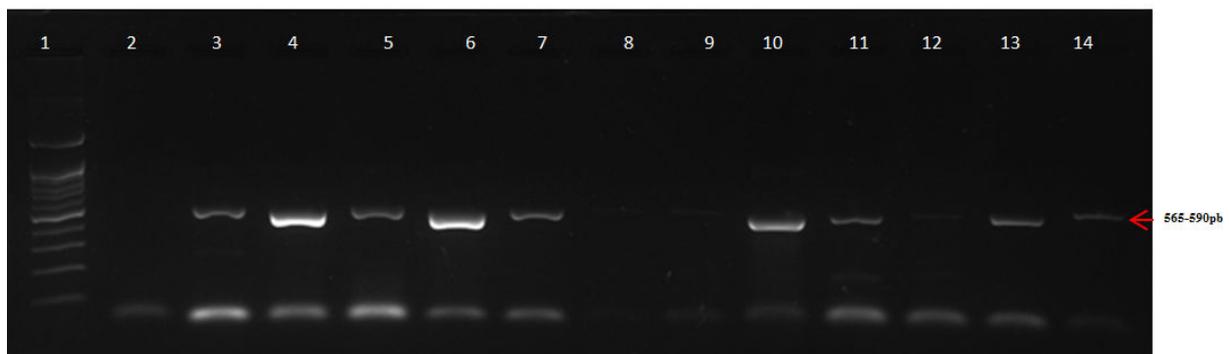


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa a 1,8 % para la detección de fragmentos del gen correspondiente al ARNr 16S de *Mycobacterium* spp. La flecha roja indica el fragmento de interés cuyo tamaño es de 565 a 590 pb. Carril1: marcador de peso molecular 100 pb; carril 2: control negativo; carriles: 3-13 se observan amplificaciones positivas para el gen ARNr 16S de *Mycobacterium* spp.; carril 14: control positivo (ADN de *Mycobacterium* spp.)./ *Agarose gel electrophoresis at 1.8 % for the detection of fragments of the gene corresponding to Mycobacterium spp. 16S rRNA. The red arrow indicates the fragment of interest whose size is from 565 to 590 bp. Lane 1: molecular weight marker 100pb; Lane 2: negative control; Lane 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13: positive amplifications are observed for Mycobacterium spp. 16S rRNA gene; Lane 14: positive control (Mycobacterium spp. DNA).*

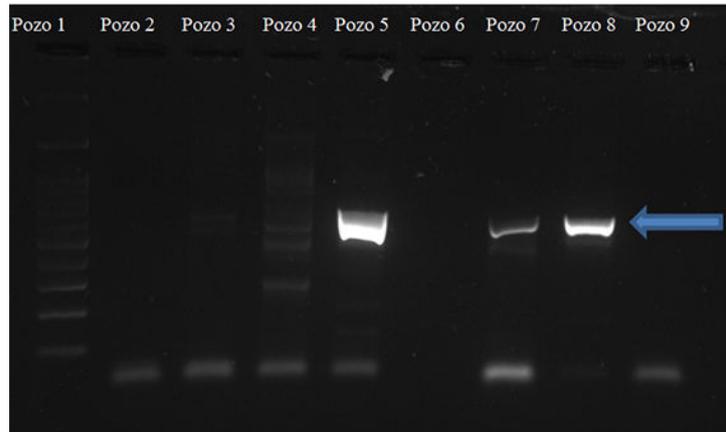


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa a 1,8 % de los productos amplificados por PCR del gen *gyrB* de *Leptospira* spp. 1: marcador de peso molecular 100 pb; 2: control negativo; 3, 4 y 5: muestras positivas para *Leptospira* spp.; y 7, 8 y 9: controles positivos (ADN de *Leptospira interrogans*). La flecha azul indica el fragmento de interés cuyo tamaño es de 502 pares de bases. / *Agarose gel electrophoresis at 1.8 % of the PCR-amplified products of the gyrB gene of Leptospira spp. 1: molecular weight marker 100 pb; 2: negative control; 3, 4 and 5: positive samples positive to Leptospira spp.; and 7, 8 and 9: positive controls (Leptospira interrogans DNA). The blue arrow indicates the fragment of interest whose size is 502 base pairs.*

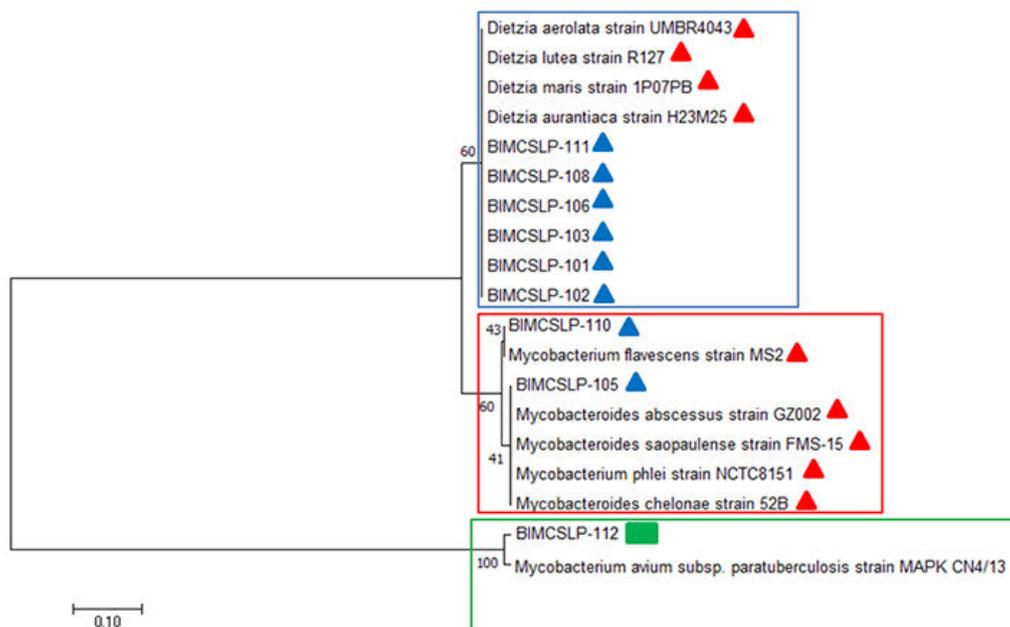


Figura 3. Identificación a nivel de especie a partir del árbol filogenético basado en el método de reconstrucción filogenética de Neighbour-joining (24), mediante el análisis filogenético del gen ARNr 16S. / *Species-level identification from the phylogenetic tree based on the Neighbor-joining methods of phylogeny reconstruction (24), by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene.*

DISCUSIÓN

Las micobacterias se dividen en dos grupos, las de crecimiento rápido y las de crecimiento lento (25,26). Los resultados del presente estudio demuestran que el 20 % (35/172) de la población bovina analizada, que habita el municipio Los

Palmitos-Sucre, está infectada con bacterias patógenas del género *Mycobacterium*. Es de suponer que, al detectar ADN de *Mycobacterium* spp. en un individuo, se debe considerar en estado infeccioso, así mismo, todo el predio se debe considerar en riesgo. Con respecto al

análisis filogenético basado en el gen ARNr 16S, las muestras secuenciadas se relacionan con el grupo de bacterias de crecimiento rápido; entre estas especies están: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium saopaulense* y *Mycobacterium chelonae* (Fig. 3). Actualmente hay descritas más de 80 especies de microbacterias de crecimiento rápido (MCR), que pueden causar un amplio espectro de infecciones que afectan principalmente a los pulmones, la piel y los tejidos blandos (27).

En el presente estudio, las muestras que resultaron positivas para *Mycobacterium* spp. por PCR, en el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S, se identificaron seis secuencias que están relacionadas con cuatro especies del género *Dietzia* (Fig. 3). Es importante mencionar que el género *Dietzia* es un microorganismo emergente poco conocido, hasta la fecha no ha sido muy estudiado. En cuanto al gen ARNr 16S, es una de las dianas comúnmente utilizadas para la identificación de bacterias o para construir relaciones filogenéticas bacterianas; sin embargo, su utilidad es limitada debido al alto porcentaje de similitud de secuencias entre especies estrechamente relacionadas (28). *Mycobacterium* spp., al igual que el género *Dietzia*, pertenecen a la clase Actinobacterias y al orden Actinomycetales. Las actinobacterias se caracterizan por ser un tipo de microorganismos ácido alcohol-resistentes (29). *Dietzia* spp. es un patógeno oportunista que puede causar infecciones localizadas y sistémicas, tanto en humanos como en animales (30).

En cuanto a la identificación de las especies *D. aerolata*, *D. lutea*, *D. maris* y *D. aurantiaca*, la presente investigación pone en evidencia un nuevo agente en la zona de estudio. Tales resultados requieren una investigación para determinar la prevalencia y el factor de riesgo a este tipo de infección, debido a que las bacterias del género *Dietzia* aparecen estar ampliamente distribuidas en el medio ambiente (31). En estudios recientes en el municipio Sincelejo, hay indicios de la presencia de otra especie del género *Dietzia* (*Dietzia timorensis*) en fincas ganaderas (32).

Con respecto al árbol filogenético, uno de sus clados muestra la relación de *Mycobacterium*

avium subespecies *paratuberculosis* (MAP) con la muestra BIMCSLP-112; resultado que no es sorprendente, debido a que BIMCSLP-112 es el control positivo que se utilizó para detectar *Mycobacterium*, control que procedía de la cepa *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* aislado de un bovino del departamento Antioquia. Además, *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* no presenta una asociación con el clado de las especies *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium saopaulense* y *Mycobacterium chelonae*; esto se atribuye a que MAP pertenece al grupo de bacterias de crecimiento lento y al complejo *Mycobacterium avium* (33). Este grupo de microorganismo de crecimiento lento engloba a las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de salud pública. En este grupo se encuadra el complejo *M. tuberculosis*, que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y en mamíferos (34). MAP es un patógeno con la capacidad de causar lesión intestinal crónica (enfermedad de Johne) en muchas especies, incluido el ganado bovino, ovino, caprino y venado de granja (35).

Por otro lado, en una de las fincas ganaderas estudiadas se encontró que tres bovinos estaban infectados por la bacteria del género *Leptospira*, identificada por PCR convencional, que se localizan en un mismo predio. Posiblemente, porque estas fincas tienen las condiciones apropiadas como zonas enmontadas, presencia o cercanía con arroyos que podrían facilitar la transmisión de la bacteria (36). En un estudio realizado por Jafari *et al.* (37), se detectaron especies del género *Leptospira* a partir de muestras de plasma en ganado mediante PCR; posiblemente estos animales estaban en la primera etapa de la enfermedad y su sistema inmunológico aún no había eliminado por completo las bacterias de la sangre. Considerando los datos anteriores, podría decirse que estos animales positivos estarían participando en la transmisión de la bacteria; la existencia de *Leptospira interrogans* en Los Palmitos-Sucre es de preocupar, debido a que es un microorganismo patógeno para los mamíferos, tanto domésticos

como silvestres, y también puede afectar al hombre (36).

Las bacterias patógenas inducen grandes pérdidas económicas en la producción pecuaria, debido a sus consecuencias en la disminución de la producción lechera, mayor predisposición al desarrollo de otras patologías, menor valor comercial de los animales y el aumento de las tasas de sacrificio, del mismo modo es un problema para la salud pública (38).

CONCLUSIONES

Especies de los géneros *Mycobacterium* y *Leptospira* están presentes en bovinos del municipio los Palmitos, lo cual indica un riesgo para la producción ganadera, los humanos y las distintas especies animales que habitan en la zona, debido a la patogenicidad de las especies detectadas. Se muestra la presencia de especies del género *Dietzia* en ganado bovino del municipio los Palmitos, Sucre-Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Sucre y al Laboratorio Investigaciones Biomédicas, por brindar el espacio y los recursos para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Michel G, Reyes J, Michel H, Davila R, Rocha G, Iñiguez A, et al. Módulo de clínica de bovinos: Enfermedades bacterianas endémicas primera edición ed. Jalisco, México.2013.
2. Guerra M. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals* 41: 295-297. 2013(1095-8320).
3. Betancur C, Orrego A, González M. Seroepidemiología de la leptospirosis en bovinos con trastornos reproductivos en el municipio de Montería. *Rev Med Vet.* 2013; (26):47-55.
4. Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology.* 2010.
5. Fornazari F, da Silva R, Richini V, Beserra H, Luvizotto M, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods.* 2012;90(3):321-326.
6. Langoni H, Souza L, Silva A, Luvizotto M, Paes A, Lucheis S. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev Vet Med.* 1999;40:271-275.
7. Kazda J, Pavlik I, Falkinham J, Hruska K. *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health.* 2009.
8. Romero B. *Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implicación en Sanidad animal y Salud Pública* Madrid: Universidad Complutense de Madrid.2012.
9. Jelalu K, Berhanu S, Aklilu A, Yitagele T, Ketema T, Kiros W, et al. Bovine tuberculosis in eastern Ethiopia: prevalence, risk factors and its public health importance. *BMC Infectious Diseases.* 2019;19(1):39.
10. Sweetline A, Ronald B, Senthil K, Thangavelu A. Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland).*2019;114:113-118.
11. Iturra L. Evaluación del impacto económico de la erradicación de tuberculosis bovina en predios lecheros infectados. Chile: Universidad de Chile. 2016.
12. Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM. Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathogens.*2010;2(1):11.
13. Dziejzinska R, Slana I. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis - An Overview of the Publications from 2011 to 2016. *Current Clinical Microbiol Reports.* 2017;4(1):19-28.
14. Aguilera A. *Economía Regional: La Economía del Departamento de Sucre: Ganadería y Sector Público.* Colombia. 2005.
15. Codazzi IgA. *Diccionario Geográfico de Colombia* Tercera edición ed. Colombia. 1996.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988;16(3):1215.
17. Tevere V, Hewitt P, Dare A, Hocknell P, Keen A, Spadaro J, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR Amplification with Pan-*Mycobacterium* Primers and Hybridization to an *M. tuberculosis*-Specific Probe. *J Clinical Microbiol.* 1996;34(4):918-923.
18. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and

- sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *J BMC Microbiol.* 2006;6:95.
19. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12):5463-5467.
 20. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. 2016.
 21. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Molecular Biology.* 1990;215(3):403-410.
 22. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 1980;16(2):111-120.
 23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution.* 2013;30(12):2725-2729.
 24. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 1987;4(4):406-425.
 25. García P, García L. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(4):162-200.
 26. Lourenço C, Whipps C, Kayoko C, Chimara E, Droz S, Tortoli E, et al. *Mycobacterium saopaulense* sp. nov., a rapidly growing mycobacterium closely related to members of the *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group. *Syst Evol Microbiol.* 2015;65(12):4403-4409.
 27. Camarena J, González R. Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 2011;29(5):66-75.
 28. Wang L-T, Lee F-L, Tai C-J, Kasai H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2007;57:1846-1850.
 29. Fernández M. Identificación y poder patógeno de microorganismos del género "corynebacterium" aislados de muestras clínicas. Madrid: Complutense de Madrid; 2009
 30. Koerner R, Goodfellow M, Jones A. The genus *Dietzia* : a newhomefor someknownand emerging opportunist pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55:296-305.
 31. Hamid ME. *Dietzia* species as a cause of mastitis: Isolation and identification of five cases from dairy cattle. *academic.* 2013;7(29):3853-3857.
 32. Caraballo L, Castellar A, Pardo E. *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en heces de bovinos del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia. *Inv Vet Perú.* 2018;29(3):987-995.
 33. Mendoza J, Lana R, Díaz M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2009;1r5(4).
 34. Sweetline A, Ronald B, Kumar T, Kannan P, Thangavelu A. Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol.* 2017;198:81-87.
 35. Uzoigwe J, Khaitisa M, Gibbs P. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect.* 2007;135(7):1057-1068.
 36. Johnson M, Smith H, Joseph P, Gilman, Bautista C, Campos K, et al. Environmental Exposure and Leptospirosis. *Peru Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):1016-1022.
 37. Jafari Dehkordi A, Shahbazkia H, N. R. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. *Microbiol.* 2011;3(3):135-139.
 38. Britton L, Cassidy J, O'Donovan J, Gordon S, Markey B. Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *Vet J.* 2016;209:32-39.

Contribución de los autores: LLDC: Selección de las muestras, trabajo de laboratorio (extracciones, análisis molecular y edición de secuencias) y elaboración del manuscrito; LECB: Diseño de investigación, orientación trabajo de laboratorio, análisis de resultados; PJBT: Revisión del documento final, diseño metodológico. Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)