

from Birth to 105-Kilogram Body Weight¹. *Journal of Dairy Science* 84:830–842.

• Drackley, J. K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 24(1), 55–86.

• Gelsinger, S.L., A.J. Heinrichs, and C.M. Jones. 2016. A meta-analysis of the effects of preweaned calf nutrition and growth on first-lactation performance¹. *Journal of Dairy Science* 99:6206–6214.

• Mendoza, A., S. De Trinidad, C. Viñoles, C. Cajarville, T. Morales, M. Pla, D. Ubilla, J. Soutto and E. Garófalo 2016. Effect of preweaning plane of nutrition on body size and age at puberty in dairy calves. Book of Abstracts of the 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science: Belfast, United Kingdom, 29 August - 2 September 2016. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

• NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

• Soberon, F., and M.E. Van Amburgh. 2013. LACTATION BIOLOGY SYMPOSIUM: The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: A meta-analysis of current data. *Journal of Animal Science* 91:706–712.

• Soberon, F., and M.E. Van Amburgh. 2017. Effects of preweaning nutrient intake in the developing mammary parenchymal tissue. *Journal of Dairy Science* 100:4996–5004.

• Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.

Aplicación de métodos moleculares para la identificación y genotipificación de especies patógenas de *Leptospira* en muestras clínicas de bovinos

Cecilia Nieves^{1,2}, Camila Hamond^{2,3}, Florencia Buroni⁴, Rodolfo Rivero⁴, Alejandra Suanes⁵, Ximena Salaberry⁵, Melissa Macías-Rioseco³, Caroline Silveira³, Federico Giannitti³, Franklin Riet-Correa³, Alejandro Buschiazzo¹, Leticia Zarantonelli^{1,2*}.

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

²Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI), Institut Pasteur de Montevideo / Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Montevideo, Uruguay. ³Plataforma de Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

⁴División Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino", Laboratorio Regional Noroeste, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Paysandú, Uruguay. ⁵Departamento de Bacteriología, División Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino", Sede Central, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay.

*Autor de correspondencia: lzarantonelli@pasteur.edu.uy.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo la identificación y tipificación de cepas de *Leptospira* spp. en tejidos provenientes de casos de aborto en bovinos, utilizando métodos moleculares. Se detectó la presencia de ADN de especies patógenas de *Leptospira* por amplificación por PCR del gen *lipL32* y se realizó la identificación y tipificación de las mismas mediante amplificación

y secuenciación parcial de los genes *rrs* (ARN ribosomal 16S) y *secY*. Se analizaron los amplicones de estos dos genes en muestras de tejidos provenientes de nueve fetos abortados, positivos para el gen *lipL32*. El análisis filogenético de las secuencias *rrs* y *secY* permitió determinar la especie del agente como *L. interrogans* en todas las muestras de fetos abortados. Las especies identificadas son del mismo genotipo *secY* que el encontrado recientemente en de aislamientos de *L. interrogans* obtenidos a partir de bovinos adultos (de campo y en fri-

gorífico) en Uruguay. Estos resultados muestran que es posible obtener datos de identificación y tipificación de especies patógenas de *Leptospira* directamente a partir de muestras biológicas resultando así en una herramienta útil para la realización de estudios epidemiológicos en casos clínicos de leptospirosis en los cuales no es posible llegar a la obtención de un cultivo puro.

Summary

The aim of this study was to identify and genotype *Leptospira* spp. strains in tissue samples from cases of abortions in cattle, using molecular approaches. The DNA of pathogenic *Leptospira* spp. was detected by PCR amplification of the *lipL32* gene. Further identification and typing was carried out by amplification and partial sequencing of the *rrs* (rRNA 16S) and *secY* genes.

The amplicons of the latter two genes were analyzed in tissue samples from nine aborted fetuses, positive for *lipL32*. Based on phylogenetic analyses of the *rrs* and *secY* sequences, the *L. interrogans* species was determined in all these samples. This genotype is identical to the one recently found in isolated *L. interrogans* strains obtained from adult animals in Uruguay (in the field and slaughterhouses). We can conclude that this molecular approach enables identification and typing of pathogenic *Leptospira* directly from biological samples, representing a useful tool to carry out epidemiologic studies of clinical cases of leptospirosis for which isolation is not possible.

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana zoonótica que sucede en diversos escenarios epidemiológicos (A. I. Ko et al, 2009), de gran relevancia médica y veterinaria. La enfermedad es producida por especies patógenas del género *Leptospira* y tiene una amplia distribución geográfica debido al gran espectro de huéspedes mamíferos que albergan y excretan el agente de sus túbulos renales (P.N. Levett, 2001). Su diagnóstico es dificultoso, derivando en la subestimación de su incidencia (R. A. Hartskeerl et. al, 2011). Estimaciones por

histopatología y serología han reportado que 30% de los abortos de etiología infecciosa en bovinos en Uruguay son debidos a leptospirosis, por lo que es considerada una enfermedad de relevancia que afecta la reproducción y consecuentes impactos económicos (M. C. Easton, 2006). Se pueden aislar cepas de *Leptospira* spp. a partir de muestras de orina de animales infectados crónicamente, así como también de diferentes tejidos provenientes de fetos abortados, utilizando técnicas de cultivo microbiológico. Sin embargo, el cultivo de *Leptospira* es dificultoso debido, en parte, a los requerimientos nutricionales de la bacteria, así como también a la calidad de las muestras frecuentemente no óptimas en condiciones de campo (autólisis y contaminación con otros géneros bacterianos) (R. T. Chideroli et. al., 2017). Es por ello que no se recurre al aislamiento como herramienta diagnóstica, prefiriendo en cambio el diagnóstico serológico por test de aglutinación microscópica y/o el diagnóstico molecular mediante detección del ADN del agente infeccioso por PCR. En el diagnóstico por PCR, además de la detección de genes específicos de especies patógenas de leptospirosis una herramienta muy utilizada es la secuenciación de los genes *rrs* y *secY* (P. Bourhy et al, 2013, C. Hamond et al, 2016). El análisis de las secuencias del gen *rrs* permite la determinación de especie y el análisis filogenético del gen *secY* permite identificar distintos genotipos dentro de una misma especie (C. Hamond et al, 2016, J. Perez and C. Goarant, 2010). El uso de estas herramientas es muy útil para la realización de estudios epidemiológicos cuando se dificulta aislar la bacteria por cultivo microbiológico. En este trabajo se describe la detección, identificación y genotipificación de especies patógenas de *Leptospira* a partir de muestras biológicas de diferentes tejidos provenientes de casos de abortos en bovinos.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 107 casos de abortos en bovinos entre mayo de 2015 y diciembre de 2017, que fueron enviados a los laboratorios de DILAVE (regional noroeste, n=25 y sede central, n=50) y Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela (n=32) para diagnóstico diferencial de aborto. El material cadavérico fue procesado en cada uno de los laboratorios según protocolos

establecidos. Los órganos fueron procesados en *Stomacher* y 2 mL de homogenato fueron enviados a la Unidad Mixta Pasteur + INIA para extracción de ADN y posterior realización de PCR. La extracción y purificación de ADN se realizó con el kit comercial PureLink® Genomic DNA (Invitrogen). La detección de ADN de especies patógenas de *Leptospira* se realizó mediante amplificación del gen *lipL32* utilizando los oligonucleótidos *lipL32F* y *lipL32R* (N. Ahmed et al, 2006). En las muestras donde se detectó ADN de leptospirosis patógenas se realizó luego amplificación por nested-PCR de un fragmento de los genes *rrs* y *secY* utilizando los oligonucleótidos LA y LB (F. Mérien et.al., 1992) en el primer ciclado y LC y RS4 en la nested-PCR para el gen *rrs* (D. Postic et.al., 2000); y los oligonucleótidos *secYF* y *secYR* en el primer ciclado, y *SecYIVF* y *SecYIVR* en la nested-PCR para el gen *secY* (P. Bourhy et al, 2013). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados mediante tecnología Sanger (Macrogen, Korea). La calidad de las secuencias fue evaluada mediante el software Chromas 2.6.5 y las secuencias consenso se obtuvieron con el software BioEdit 7.05. El análisis filogenético fue realizado con el software Mega 6.0, empleando el método Neighbor-Joining, modelo Tamura-Nei; y el método *bootstrap* para computar la filogenia (1000 réplicas).

Resultados y Discusión

Se estudiaron 107 casos de aborto en bovinos entre mayo del 2015 y diciembre del 2017. Se buscó la presencia de ADN de leptospirosis patógenas mediante amplificación del gen *lipL32*, analizando un total de 229 muestras de tejidos cadavéricos incluyendo muestras de hígado (n=86), riñón (n=108), líquido abomasal (n=22), orina (n=6) y bazo (n=7). Se detectó el gen *lipL32* en 9 fetos abortados, resultando positivas 5 muestras de hígado, 5 de riñón y 1 de líquido abomasal. Excepto para una muestra de riñón en la cual no se obtuvo secuencia interpretable para el gen *rrs*, fue posible identificar con un 100% de identidad la especie *L. interrogans* en diez de las once muestras positivas. Se obtuvieron secuencias interpretables para el gen *secY* en cinco muestras de riñón, en una muestra de hígado y en una muestra de líquido abomasal. El análisis filogenético permitió agrupar estas secuencias en el clado correspondiente a la especie *L. interrogans* y se observó 100% de homología con el alelo *secY* de aislamientos de origen

bovino obtenidos recientemente por nuestro grupo e identificados como *L. interrogans* serovar Kennewicki (serogruppo Pomona) (Zarantonelli et al, PLoSNegl. Trop. Dis., manuscrito en revisión). Estos resultados están en sintonía con lo reportado en la literatura, con identificación del serogruppo Pomona, una de las serovariedades de la especie *L. interrogans* con reconocidas características abortogénicas en bovinos (S. Herr et. al., 1982, B. F. Kingscote and D. Wilson, 1986, W.A. Ellis, 2015).

Bibliografía

- A. I. Ko, C. Goarant, and M. Picardeau, "*Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen" *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 10, Oct. 2009.
- P. N. Levett, "Leptospirosis" *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 2, Apr. 2001.
- R. A. Hartskeerl, M. Collares-Pereira, and W. A. Ellis, "Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world" *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, no. 4, Apr. 2011.
- M. C. Easton, "Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay" Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2006.
- R. T. Chideroli, D.D. Gonçalves, S.A. Suphoronski, A.F. Alfieri, A. A. Alfieri, A. G., J. C. de Freitas, U. P. Pereira, "Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno" *Front. Microbiol.*, vol. 8, 2017.
- P. Bourhy et al., "Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies" *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 3, Mar. 2013.
- C. Hamond, C. P. Pestana, M. A. Medeiros, and W. Lilenbaum. "Genotyping of *Leptospira* Directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil," *Epidemiol. Infect.*, vol.144, no. 1, Jan. 2016.
- N. Ahmed et al., "Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* vol. 10, 2006
- J. Perez and C. Goarant, "Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia," *BMC Microbiol.*, vol. 10, no. 1, Jan. 2010.
- F. Mérien, P. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton, and I. Saint Girons, "Polymerase

chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples" J. Clin. Microbiol., vol. 30, no. 9, Sep. 1992.

• D. Postic, N. Riquelme-Sertour, F. Merien, P. Perolat, and G. Baranton, "Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*" Res. Microbiol., vol. 151, no. 5, Jun. 2000.

• S. Herr, A. E. Riley, J. A. Naser, D. Roux, and J. F. De Lange, "*Leptospira interrogans* serovar

Pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology" Onderstepoort J. Vet. Res., vol. 49, no. 1, Mar. 1982.

• B. F. Kingscote and D. Wilson, "*Leptospira* Pomona Abortion Storm in a Cattle Herd in Saskatchewan," Can. Vet. J. vol. 27, no. 11, Nov. 1986.

• Ellis WA. Animal leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol. 387:99-137, 2015.

Efecto de la caminata y del tiempo de ayuno sobre el pH ruminal de vacas lecheras en pastoreo

Capelesso A.^{1,2*}, Dayuto J.¹, Kozloski G.², Mendoza, A.³, Repetto J.¹ y Cajarville C.¹.

¹Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Uruguay. *ascaplesso@gmail.com

²Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. ³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar y diferenciar el impacto de la caminata y del efecto del tiempo de ayuno sobre el pH del rumen de vacas lecheras en pastoreo. Para el ensayo se utilizaron 30 vacas multiparas en lactación, que fueran asignadas según un diseño de bloques al azar, con dos semanas de previo acostumbramiento a los tratamientos: Caminata de 5 km/d [Caminata]; Ayuno (alimenticio) durante un tiempo equivalente al período de caminata del tratamiento caminata [Ayuno]; Sin ayuno y sin caminata [Control]. Para la determinación de pH del rumen, 4 vacas de cada tratamiento fueran sondeadas en el rumen. Para la colecta de muestra, durante el intervalo de 24 h se colectó muestras del líquido ruminal siendo determinado pH inmediatamente después de la colecta. En conclusión, el grupo caminata no defirió en valores de pH ruminal comparado el grupo control y se observó que el grupo ayuno presentó menores valores de pH ruminal en contraste con el grupo caminata y control.

Abstract

The objective of this study was to investigate the impact of walking or/and fasting time in rumen's pH of dairy cows under grazing. For this study thirty animals were assigned to three treatments in a randomized block design, walking 5 km/d [walk treatment]; food fasting during the same time of treatment walking [fasting treatment] and; control treatment. For rumen's pH determination, four dairy cows per treatment were rumen probed. Ruminal fluid samples were collected hourly for 24 hours to measure pH. In conclusion, rumen's pH of walking treatment was not different relative to control, and as expected fasting treatment was the lowest.

Introducción

Dado el creciente interés por la maximización de la cosecha directa de pasto en los tambos lecheros de Uruguay que, en combinación con el aumento de tamaño de las unidades producti-