

Dedicatoria

A Ana, mi esposa, con quien comparto la enorme felicidad de navegar el inmenso mar de la vida, mi gratitud por su constante apoyo y por su estímulo para abordar este trabajo.

A mi madre, por su entereza, animándome siempre a seguir adelante, sin detenerme en el camino.

A mi hermana, por estar ahí.

A Ana María Dippold, mi maestra, toda mi gratitud.

A Gertrud Rhades

Agradecimientos

La decisión de abordar esta etapa en mi formación profesional, ha devenido en una experiencia personal, no solamente académica, si no que ha ido mucho más allá.

El desafío de llevar adelante este trabajo, me ha permitido contar con el apoyo incondicional de muchas personas, quienes, no solo brindaron sus conocimientos, sino que, desinteresadamente, dedicaron tiempo y pasión al desarrollo de la tesis.

A mi Director: Marcelo Fort, quien supo reintroducirme en el fascinante mundo de la investigación microbiológica, mi gratitud por su predisposición a ayudarme en la planificación del proyecto y el desarrollo de la tesis hasta el final.

A mi Codirector: Pablo Javier Delicia, quien desde un inicio, asumió el compromiso de señalar el rumbo, marcando con entusiasmo las pautas para el desarrollo intelectual de esta tesis. No puedo dejar de reconocer su tenaz contribución, que de manera decisiva, con sus críticas y sus valiosos aportes me permitieron arribar con éxito a la meta.

A Francisco Babinec – EEA INTA Anguil, por su desinteresada ayuda, dedicando tiempo al análisis estadístico de los datos de esta tesis.

A Anibal Pordomingo - Área de Producción Animal EEA INTA Anguil - Coordinador Nacional del Programa de Calidad de Carne, por sus valiosos consejos.

A Nestor Antonio Juan - EEA INTA Anguil, por su desinteresada colaboración en la corrección del texto en inglés.

A Mariano Larzabal - Instituto de Biotecnología INTA Castelar

A Gerardo Leotta – Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout", Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, CCT La Plata CONICET.

A Ignacio Galli, EEA INTA Concepción del Uruguay

A Elsa Mercado - Instituto de Patobiología INTA Castelar

A Daniel Vilte - Instituto de Patobiología INTA Castelar

A Marta Rivas - Jefe Servicio Fisiopatogenia INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

A Natalia Amigo - Instituto de Biotecnología INTA Castelar

A Valeria Baldone – Área Salud Pública Veterinaria EEA INTA Anguil

A Lucas Urquiza - Área Salud Pública Veterinaria EEA INTA Anguil

A Karina Bonetti - Área Salud Pública Veterinaria EEA INTA Anguil

A Lucas Gelid - Área de Producción Animal EEA INTA Anguil

Al Frigorífico General Pico S. A. por permitir el seguimiento de la faena de los animales y el posterior esponjado de las carcasas en la cámara de oreo

Mi gratitud por la hospitalidad a quienes me albergaron durante el desarrollo del trabajo

A todos ellos, mi eterno agradecimiento.

Fecha: junio de 2017

Glosario de siglas y abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARMS	Anal rectal mucosa swabbing
ARN:	Ácido Ribonucleico
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
BPM	Buenas prácticas de manufactura
CINa	Cloruro de sodio
CIK	Cloruro de potasio
CH	Colitis hemorrágica
CP	Crude protein
DTF	Diseases transmitted by food
E. coli:	Escherichia coli
ECEA:	E. coli enteroagresiva
ECEH:	E. coli enterohemorrágica
ECEI:	E.coli enteroinvasiva
ECEP:	E. coli enteropatógena
ECET:	E. coli entero tóxica
EEA:	Estación Experimental Agropecuaria
EEUU:	Estados Unidos
ECM:	Eucariotical celular membrana
EFSA:	European Food Safety Authority
EM:	Estación Meteorológica
Esp:	E. coli secreted protein
EspA:	E. coli secreted protein A
EspB:	E. coli secreted protein B
ETA:	Enfermedad transmisible por alimentos
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBD	Food borne diseases
GECP	Gel electroforesis en campo pulsado
GMP	Good manufacturing practices
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HMRA:	Hisopado mucosa recto anal
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IM:	Internal membrana
LPS:	Lipopolisacarido

LUV:	Luz ultra violeta
MEB:	Membrana externa bacteriana
MCE:	Membrana celular eucariota
MF:	Materia fecal
MIB:	Membrana interna bacteriana
mm:	milímetro
MRA:	Mucosa recto anal
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico anhidro
NM:	No móvil
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PB:	Proteína bruta
PBS TWIN:	Solución Salina Amortiguada - Fosfatos o Phosphate Buffered Saline
PCP:	Placa concentradora de partículas
PCR:	Polimerasa Chain Reation-Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRRT:	Polimerasa Chain Reation Real Time - Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
PFD	Preventing foodborne disease
PFGE	Pulsed field gel electroforesis
PG:	Peptidoglicano
PO ₄ KH ₂	Potasio monobásico anhidro
PRA:	Pliegue recto anal
PV:	Peso vivo
RA:	Recto-anal
RASFF:	Rapid Alert System for Food and Feed
SNC:	Sistema Nervioso Central
S. dysenteriae:	Shigela dysenteriae
SIM:	Separación inmuno magnética
SMAC _{CT} :	Agar Mac Conkey sorbitol + suplemento de cefixima telurito de potasio
STEC:	Escherichia coli productora de Shiga toxinas
Stx1:	Shiga toxina 1
Stx2:	Shiga toxina 2
Stx12:	Shiga toxina12
SUH:	Síndrome urémico hemolítico

TSB:	Tripticasa soy broth - caldo tripticasa soja
TGI:	Tracto gastrointestinal
Tir:	Translocated intiminn receptor
TTSS:	Type three-secretion system
UC:	Unidad Centinela
UC SUH	Unidad Centinela Síndrome Urémico Hemolítico
UFC:	Unidades formadoras de colonias
USA:	United States of America
USDA:	Unated States Department of Agriculture
USFDA	Unated States Food and Drogs Administration
Vtx:	Vero toxinas
WHO:	World Health Organization

Trasmisión y persistencia de *E. coli* O157:H7 en bovinos

Índice de contenidos

Resumen

Escherichia coli enterohemorrágica EHEC O157:H7 es un patógeno causante de enfermedades transmisibles por alimentos (ETA). Una de ellas, el síndrome urémico hemolítico (SUH), es la más grave, por la producción de la toxina Shiga (Stx). El SUH afecta en forma endémica en la Argentina a niños de entre 6 meses y 6 años de edad. Los bovinos son los principales reservorios primarios de EHEC O157:H7 y la principal fuente de infección para los seres humanos. En esta tesis se abordan los aspectos inherentes a la identificación y seguimiento de animales excretores de EHEC O157:H7 y sus factores de virulencia, las toxinas Shiga, en un establecimiento ganadero de la provincia de La Pampa, Argentina. Para el estudio, se albergaron 120 terneros, dispuestos en 36 corrales, encerrando entre 3 y 4 en cada uno, distribuidos en 18 corrales de livianos, con 128 kg de peso vivo de promedio; y 18 de pesados, con 197 kg de promedio. Desde marzo hasta junio de 2014, los animales permanecieron encerrados, salieron a pastorear desde julio hasta noviembre y retornaron al encierre desde diciembre hasta la finalización del ensayo, en abril de 2015. Durante ese lapso se hicieron hisopados mensuales de la mucosa recto anal (HMRA), para cultivo e identificación de EHEC O157:H7 y posterior caracterización, con PCR Multiplex, de los genes que codifican los factores de virulencia. Al inicio del ensayo se detectó una prevalencia de *Escherichia coli* productora de Shiga toxinas (STEC) del 10,83%; y al finalizar del 5,08%. Se determinó que el 100% de los animales identificados como excretores de EHEC O157:H7 portaban el gen *eae* de la región constante de intimina y el gen *rfbO*₁₅₇, responsable de la síntesis del antígeno somático O. Al inicio del ensayo se identificaron los genes de las toxinas Stx1, Stx2 y Stx1 - Stx2, detectándose al final solamente los genes de la Stx2 y Stx1 - Stx2. El gen que expresa a la toxina Stx2 se manifestó constante durante todo el período de análisis, destacándose en primavera una elevada presencia Conjunta de Stx1 y Stx2; mientras que el gen para la Stx1 solo se detectó en los primeros tres muestreos. Se buscó relacionar la influencia de posibles factores predisponentes para la excreción de STEC y la presencia de sus factores de virulencia, como el peso, la dieta, el efecto de las precipitaciones, las temperaturas y los factores de manejo. Durante la recría a corral (marzo a junio 2014), los animales pesados excretaron más STEC que los animales livianos; mientras que durante el pastoreo (julio a noviembre 2014), no hubo diferencias entre livianos y pesados. Durante la terminación a corral (diciembre 2014 a abril

2015), se encontró que los livianos excretaron significativamente mayor cantidad de STEC que los pesados. La portación de genes Stx es variable. El gen Stx1 se detectó en terneros jóvenes y no se vuelve a expresar en los HMRA posteriores. La presencia de Stx2 se mantuvo constante durante el periodo de estudio; dato importante, ya que este factor de toxicidad está asociado con la patogenia del SUH, habida cuenta que esta variante es la responsable del mayor número de causas de muerte en niños que padecen la enfermedad. La portación conjunta de los genes Stx1 y Stx2 es elevada en marzo y significativamente mayor durante el pastoreo de setiembre y noviembre. También se encontró que la relación entre las temperaturas y las precipitaciones con la presencia conjunta de los genes que codifican la expresión de la **Stx1 y Stx2** era significativa, lo que indica que si aumenta la lluvia y/o la temperatura media, aumenta la presencia conjunta de Stx1 y Stx2. El análisis sobre la influencia de los factores de manejo, la excreción de STEC y la presencia de las Stx, reveló que dichos factores están confundidos con las variables ambientales. Determinar su relación requiere de un ensayo que contemple mantener las variables ambientales constantes, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio. Considerando el nivel de prevalencia encontrado en los novillos, previo a su envío al frigorífico (5,08%), no fue posible identificar E. coli O157:H7 en las carcasas. Se concluye que con estos niveles de infección y con la implementación de buenas prácticas de faena, las probabilidades de contaminación de la carne son muy bajas. La realización de trabajos transversales y longitudinales que permitan estimar la magnitud y la distribución de la enfermedad por un lado y factores de riesgo por otro, son de importancia para el avanzar en la adopción de medidas preventivas, que contribuyan a disminuir la prevalencia de STEC en el ganado bovino destinado a faena y consecuentemente propender a una reducción del número de casos de SUH.

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7 is a pathogen causing several food borne diseases (FBD). One of them, the hemolytic uremic syndrome (HUS), is the most serious, because of the production of Shiga toxin (Stx). In Argentina HUS affects in an endemic way children between 6 months and 6 years old. Cattle are the main primary reservoirs of EHEC O157: H7 and the main source of infection for humans. This thesis is an approach to the identification and monitoring of the *E. coli* O157: H7 excretors and the presence of the virulence factors, the Stx, in a cattle farm located in the province of La Pampa, Argentina. We studied 120 calves, arranged in 36 pens, each pen included 3 to 4 calves. Eighteen pens were occupied by light calves (average 128 kg live weight) and the other 18 were occupied by heavy calves (average 197 kg live weight). From March to June 2014, animals remained in pens. From July to November 2014, they were grazing pastures and they returned to the pens from December until the end of the study, in April 2015. Monthly swabs of rectal anal mucosa (HMRA) were made to allow culture and identification of EHEC O157: H7, and further characterization of the genes encoding factors of virulence, using Multiplex PCR. A prevalence of *Escherichia coli* Shiga toxins producer (STEC) of 10.83% and of 5.08% was detected at the beginning and at the end of the study, respectively. It was determined that 100% of the animals identified as shedders of EHEC O157: H7 carried the gene **eae** of the constant region of intimin, and the **rfbO₁₅₇** gene, responsible for the synthesis of somatic antigen O. At the beginning, genes responsible for toxins Stx1, Stx2 and Stx1 - Stx2 were identified, but only genes for Stx2 and Stx1 - Stx2 were detected at the end. Although the gene expressing the Stx2 toxin showed constantly throughout the study, the highest presence of Stx1 - Stx2 was detected in the spring. The gene for Stx1 was detected only in young animals in the first three samplings. We tried to relate possible predisposing factors for STEC excretion with the presence of virulence factors such as live weight, diet, rainfall, temperature, and management factors. During rearing in pens, heaviest animals excreted more STEC than lighter animals, but during the following grazing period; there was no difference between them. The Stx gene carrier is variable. The Stx1 gene was detected in young calves but it was not expressed in subsequent HMRA. The presence of Stx2 remained constant during the study. This fact is important, because this toxicity factor is associated with the pathogenesis of HUS, since this variant is responsible for the highest number of causes of death in children suffering from the disease. Portion of the Stx2 gene was high in March and significantly higher during September and November grazing. We also found that the relationship between temperature and precipitation with the presence of genes encoding Stx1 - Stx2 expression was significant; indicating that increases in rain and / or average temperature increases the presence of Stx1

and Stx2. The analysis of the influence of management factors on STEC excretion and presence of Stx revealed that those factors were confused with environmental variables. Determine that relationship requires an essay that includes maintaining environmental variables constant, a situation that is not consistent with the experimental context of this study. Considering the level of prevalence found in steers, prior to shipment to the slaughterhouse (5.08%), it was not possible to identify E. coli O157: H7 in the carcasses. It is concluded that with these levels of infection and with the implementation of good slaughter practices, the probability of meat contamination is very low. The accomplishment of transversal and longitudinal works that allow to estimate the magnitude and the distribution of the disease and the risk factor, are important to progress in the adoption of preventive measures that contribute to decrease the prevalence of STEC in cattle destined for slaughter and consequently to reduce the number of HUS cases.

Índice de capítulos

Organización de la tesis

En el **Capítulo 1** se aborda el estado del arte con referencia al patógeno *Escherichia coli* en general y en particular una revisión sobre *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) que tiene capacidad de generar enfermedad. Se toma revista de las toxinas Shiga, principal factor de virulencia de EHEC, sus mecanismos de acción, la interacción con la mucosa intestinal

En el **Capítulo 2** se aborda la evolución de la intensificación de los sistemas agropecuarios y su relación con los procesos de transformación del sistema de producción de carne y se hace una reseña sobre la patogenia y la epidemiología la enfermedad, tanto en los seres humanos como en los animales. También se plantean los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en el hombre y particularmente en los animales. Por último se argumenta sobre los efectos de la presencia de la *E. coli* O157:H7 sobre el comercio de alimentos y sus consecuencias.

En el **Capítulo 3** se presenta una justificación y pertinencia temática, se formulan las hipótesis y se fijan los objetivos de la tesis.

El **Capítulo 4** se describe el universo del ensayo propuesto, para el seguimiento del comportamiento de excreción de *E. coli* O157:H7 a lo largo del tiempo, en animales destinados para engorde con destino a faena.

En el **Capítulo 5** se abordan, en una primera instancia, los temas inherentes a la preparación de los insumos, materiales y medios de enriquecimiento, utilizados, para la recolección y procesamiento de las muestras tomadas en el campo, a través del HMRA.

En segundo término, los materiales, medios de cultivo, reactivos y métodos para el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

En tercer término se describen, la metodología para la purificación del genoma de las cepas de *E. coli* aisladas y la identificación molecular mediante el uso de la técnica de PCR Múltiple, para la detección e identificación combinada los genes de la región constante de Intimina (*eae*), de las Stx1 y Stx2 y sus variantes.

En el **Capítulo 6** se exponen los resultados de los aislamientos y de las pruebas de análisis para la detección e identificación de los genes de la región constante de Intimina (**eae**), de los genes que codifican las citotóxicas Stx1, Stx2 y sus variantes en la E. coli O157:H7.

Se presenta el análisis, relacionando la cantidad de animales excretores de STEC vinculados con posibles factores predisponentes, como variables climáticas ligadas a las lluvias y la temperatura ambiente.

Se analiza la asociación entre la composición de las distintas dietas a las que fueron sometidos los animales, durante el periodo de engorde y la excreción de E. coli O157:H7, así como la presencia de los genes que codifican las Stx.

Por otro lado, se indaga sobre los efectos del estrés emergente, como consecuencia del ingreso a los corrales, la castración y las vacunaciones, como posibles responsables de la excreción de E. coli O157:H7.

Se analiza la edad y el peso de los animales, relacionados con los patrones de excreción de E. coli O157:H7 y la presencia de los genes que codifican las toxinas Shiga.

En el **Capítulo 7** se contrastan los resultados obtenidos con los de otros autores.

El **Capítulo 8** se destina a las conclusiones a las que arriba esta tesis luego de la discusión planteada en el capítulo anterior.

En el **Capítulo 9** se presentan, de acuerdo a los resultados obtenidos y a las conclusiones arribas, las líneas a abordar en futuros trabajos de investigación.

En el **Capítulo 10** se incluyen como Anexos, tablas, gráficos, fotografías y toda la información adicional, que permita optimizar la descripción de los trabajos realizados, para mejorar la comprensión de los resultados a los que se ha llegado en el abordaje de esta tesis.

Capítulo 1: Agente infeccioso 24

1.1.- Introducción	24
1.2.- Generalidades de la Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)	24
1.3.- Descripción particular de la EHEC	26
1.4.- Las toxinas Shiga	29
1.5.- Acción de las toxinas Shiga	30
1.6.- Diferencia entre Stx1 y Stx2	30

Capítulo 2: Patogenia y epidemiología de la enfermedad 31

2.1.- Introducción	31
2.2.- Generalidades	31
2.3.- Patogenia de la enfermedad en el hombre	33
2.4.- Patogenia de la enfermedad en los animales	34
2.5.- Epidemiología de la enfermedad en el ser humano	36
2.6.- Epidemiología de la enfermedad en animales y factores de riesgo para en ser humano	38
2.7.- Estudios longitudinales y transversales de STEC en bovinos	39
2.8.- Factores nutricionales que influyen en la excreción de STEC	41
2.9.- Presencia de los factores de virulencia Stx	43
2.10.- Relación de los factores ambientales con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga	44
2.11.- Temperatura y lluvia como factores predisponentes para la Excreción de STEC	44
2.12.- Relación del peso de los animales con la excreción de STEC	46
2.13.- Presencia de la E. coli O157:H7 en los productos alimenticios	46
2.14.- Efectos y consecuencias de la presencia de STEC sobre el comercio de alimentos	47

Capítulo 3: Justificación temática, hipótesis y objetivos 50

3.1.- Justificación y pertinencia temática	50
3.2.- Hipótesis	51
3.3.- Objetivos	52

3.3.1.- Objetivo general: finalidad	52
3.3.2.- Objetivos específicos	52

Capítulo 4: Protocolo experimental – Instalaciones, animales

y muestreo 53

4.1.- Introducción	53
4.2.- Animales e instalaciones	55
4.3.- Etapas del ensayo	59
4.3.1.- Recría a corral	59
4.3.2.- Pastoreo a campo	60
4.3.3.- Dieta de acostumbramiento en los corrales	61
4.3.4.- Terminación en confinamiento	61

Capítulo 5: Materiales y Métodos 63

5.1.- Introducción	63
5.2.- Materiales	63
5.2.1.- Preparación del caldo de enriquecimiento tripticasa-soja (TSB)	63
5.2.2.- Preparación de la Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) + Polioxietileno monolaurato de sorbitán 20 (Tween 20)	64
5.2.3.- Preparación de Agar Mac Conkey Sorbitol + suplemento de Cefixima Telurito de Potasio (SMAC _{CT}) + Suplemento Mug	64
5.2.4.- Preparación de Agar Agar Mac Conkey	66
5.2.5.- Preparación del caldo de enriquecimiento modificado (TSBm + 8 mg novobiocina)	66
5.2.6.- Preparación del caldo de enriquecimiento de agua peptonada (CEAP)	67
5.2.7.- Esponjas de poliuretano	67
5.3.- Métodos	68
5.3.1.- Toma de muestras de la Mucosa Recto – Anal (MRA)	68
5.3.1.1.- Separación inmunomagnética de E coli O157 (SIM)	69
5.3.1.1.2.- Fundamento	69
5.3.1.1.3.- Procedimiento	70
5.3.1.2.- Cultivo selectivo de Escherichia coli 0157	71

5.3.1.3.- Prueba de aglutinación de látex para la identificación de la E. coli O157:H7	72
5.3.1.4.- Congelación y conservación	73
5.3.2.- Esponjado de medias reses en cámara de oreo	73
5.3.2.1.- Toma de muestras	74
5.3.3.- Prueba de validación de las cepas aisladas	74
5.3.4.- Extracción de ADN	75
5.3.4.1.- Método para la extracción de ADN	75
5.4.- PCR reacción en cadena de la polimerasa	77
5.4.1.- PCR Multiplex para la detección de E. coli O157:H7, <i>eae</i> , Stx1, Stx2, <i>rfbO</i> ₁₅₇	77
5.5.- Toma de datos	78
5.6.- Análisis estadístico	79

Capítulo 6: Resultados

80

6.1.- Introducción	80
6.2.- Excreción de STEC	81
6.3.- Presencia de Shiga toxinas	83
6.4.- Distribución en los corrales de los animales excretores de STEC portando los genes de las diferentes Shiga toxinas	87
6.5.- Resultado de la probabilidad de excreción de STEC de acuerdo al peso y nivel de PB en la dieta	88
6.6.- Relación de los pesos (livianos y pesados) de los animales con la excreción de STEC durante el periodo de recría, campo y terminación	89
6.7.- Presencia de genes de Shiga toxinas de acuerdo al nivel de PB por etapa de engorde	90
6.7.1.- Relación de los genes que codifican la expresión de las Stx con los periodos de recría, campo y terminación	91
6.8.- Registros climáticos	92
6.8.1.- Temperaturas	92
6.8.2.- Relación entre temperatura y excreción de STEC	93
6.8.3.- Relación entre temperatura y la presencia de los genes de Stx	95
6.9.- Precipitaciones	96
6.9.1.- Relación entre precipitaciones y excreción de STEC	98
6.9.2.- Relación entre precipitaciones y la presencia de Stx	99

6.10.- Relación ente factores ambientales (lluvia y temperatura) con la excreción de STEC	101
6.11.- Relación ente factores ambientales (lluvia y temperatura) con la presencia de los genes de virulencia Stx	101
6.12.- Factores de manejo	103
6.12.1.- Relacion entre las condiciones de manejo y la excreción de STEC	104
6.12.2.- Relaciones entre las condiciones de manejo y la presencia de Stx	104
6.13.- Resultado del análisis del esponjado de las medias reses en la cámara de oreo	104
6.14.- Dificultades presupuestarias para la ejecución del protocolo experimental previsto	105

Capítulo 7: Discusión de resultados

106

7.1.- Prevalencia de STEC	106
7.2.- Eliminación de STEC en bovinos de acuerdo a la estación del año	110
7.3.- Presencia de los factores de los factores de virulencia Shiga	112
7.4.- Relación de los factores climáticos con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga	114
7.5.- Relación de los factores ambientales y de manejo con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga	114
7.6.- Relación de peso y las características de la alimentación con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga	115
7.7.- Discusión de las Hipótesis	117
7.7.1.- Discusión Hipótesis 1	118
7.7.2.- Discusión Hipótesis 2	118
7.7.3.- Discusión Hipotesis 3	118
7.7.4.- Discusión Hipótesis 4	119
7.7.- Discusión sobre los aspectos de la influencia de las dificultades económicas para conseguir los insumos de laboratorio en los resultados de los ensayos	120

Capítulo 8: Conclusiones

121

Capítulo 9: Perspectivas futuras 124

Capítulo 10: Anexos 125

10.1.- Información complementaria: trabajos presentados

10.1.1.- IV Seminario de Investigación en Extensión - Centro Regional La Pampa – San Luis – Maestría Sociedad e Instituciones de la Facultad de Ciencias Económicas, Jurídicas y Sociales de la Universidad Nacional de San Luis 134

10.1.2.- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – XXI Reunión Científico Técnica “Dr. Bernardo Jorge Carrillo” 134

10.1.3.- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – XXI Reunión Científico Técnica “Dr. Bernardo Jorge Carrillo” 134

Bibliografía consultada 135

Índice de figuras

Fig. 1: Micrografía electrónica de E. coli O157:H7. (50000X)	25
Fig. 2: Principales componentes de la pared de la E. coli	27
Fig. 3: Interacción e Interrelación entre Salud Humana – Salud Animal – Salud Ambiental según FAO – OIE - WHO	51

Índice de gráficos

Gráfico 1: Secuencia de la eliminación de STEC de los animales excretores, por fecha de HMRA, a lo largo del ciclo de engorde	82
Gráfico 2: Distribución anual de la presencia de los distintos tipos de Stx Durante el ensayo	84
Gráfico 3: Distribución de los genes que codifican la expresión de las citotoxinas Shiga Stx1, Stx2 y Stx1 - Stx2	84
Gráfico 4: Análisis descriptivo mostrando en porcentaje, la proporción de animales excretores de STEC caracterizados por tipo de Stx producida	87
Gráfico 5: Relación del nivel de PB de la dieta en cada etapa del ciclo De engorde con la presencia de Stx1 – Stx2 y Stx1 - Stx2	91
Gráfico 6: Promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias, tomadas 15 días previos a cada HMRA	93
Gráfico 7: Relación de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la Excreción mensual de STEC	94
Gráfico 8: Relación del promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la presencia de Stx en los HMRA mensuales	96
Gráfico 9: Distribución de las precipitaciones 15 días previos al HMRA	97

Gráfico 10: Distribución de las precipitaciones acumuladas, desde marzo 2014 hasta junio 205 y resumen de los promedios del periodo 1973 – 2012, distribuidas por estaciones	98
Gráfico 11: Relación entre las precipitaciones y la excreción de STEC	99
Gráfico 12: Relación entre las precipitaciones y la presencia de los genes Que codifican los factores de toxicidad Shiga	100
Gráfico 13: Distribución de los casos de SUH según el mes de ocurrencia – La Pampa – Años 205 – 2013	132
Gráfico 14: Seritipos de STEC en casos de SUH – UC, Hospital Lucio Molas, Santa Rosa, La Pampa, año 2005 a 2013	133
Gráfico 15: Toxina Shiga libre en MF – casos SUH – UC Hospital Lucio Molas – Santa Rosa – La Pampa, año 2005 al 2013	133

Índice de tablas

Tabla 1: Resumen del manejo de los animales durante el periodo de ensayo, desde el ingreso a los corrales hasta la faena	54
Tabla 2: Factores de alimentación de acuerdo a las dietas de recría, pastoreo a campo y terminación	62
Tabla 3: Componentes para la amplificación selectiva de las secuencias específicas de ADN bacteriano dispuestas en un volumen final de 50 µ	77
Tabla 4: Primers a utilizar con la secuencia de nucleótidos de factores de virulencia de E. coli O157:H7(Invitrogen, EEUU) para amplificación del ADN en la prueba PCR multiplex	78
Tabla 5: Distribución de la cantidad de animales de acuerdo al número de excreciones en el tiempo	81

Tabla 6: Distribución a lo largo del año, de la presencia de los genes eae Y de Stx, en animales positivos a la excreción de E. coli O157:H7, diagnosticados por fecha de HMRA	83
Tabla 7: Distribución de los animales que excretan STEC en 2 y 3 oportunidades, Con la identificación de los genes que portan para la codificación de las Stx	85
Tabla 8: Distribución de las Stx en los corrales 1 al 18, donde 1 = Stx1 – 2 = Stx2 – 12 = Stx12 – 12.12 indican 2 aislamientos de Stx12 y 12.12.12 indican 3 aislamientos de Stx12 (amarillo) 2.2 indican 2 aislamientos de Stx2 en un mismo corral	87
Tabla 9: Distribución de las Stx en los corrales 19 al 36, donde 12 = Stx12 - 1 = Stx1 – 2 = Stx 2 - 12.12 indican 2 aislamientos de Stx12 y 12.12.12 indican 3 aislamientos de Stx12 (amarillo) 2.2 indican 2 aislamientos de Stx2 – 12.2 Indica la presencia de Stx12 y Stx2 – 2.1 indica la presencia de Stx2 y Stx1 en un mismo corral	88
Tabla 10: Distribución de la excreción de STEC por etapa de engorde, nivel de proteína y peso	89
Tabla 11: Análisis en relación a los pesos, se detecta en animales livianos mayor excreción de STEC durante la terminación. Los animales pesados no presentan diferencias en la excreción.	89
Tabla 12: Con respecto al porcentaje de PB en la dieta, la excreción de STEC entre los animales, tanto livianos como pesados, que consumieron una dieta con 9,5 y 13% de PB, no presenta desvíos significativos	90
Tabla 13: Relación del nivel de PB de la dieta con la presencia de Stx en cada etapa de engorde	90
Tabla 14: Análisis comparativo de la presencia de los factores de toxicidad durante recría, campo y terminación	91
Tabla 15: Análisis comparativo de la presencia de Stx entre recría versus campo y terminación	92

Tabla 16: Análisis comparativo de la presencia de Stx entre campo y terminación	92
Tabla 17: Registro del promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias, 15 días previos a cada HMRA	93
Tabla 18: Relación de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la excreción mensual de STEC	93
Tabla 19: Relación entre las temperaturas máximas, mínimas y medias con la presencia de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga	95
Tabla 20: Registro de las precipitaciones acumuladas en mm, 15 días previos al HMRA	96
Tabla 21: Distribución de las precipitaciones, desde marzo 2014 hasta junio 2015 y los promedios del periodo 1973 – 2015, distribuidas por estaciones (Estadísticas agroclimáticas de la EEA Anguil) y el registro promedio de las precipitaciones 15 días previos a cada HMRA	97
Tabla 22: Relación entre las precipitaciones y la excreción de STEC	98
Tabla 23: Relación entre las precipitaciones y la presencia de los genes que Codifican los factores de toxicidad Shiga	99
Tabla 24: Estimaciones de los parámetros utilizando Máxima Verosimilitud, los coeficientes de lluvias y temperatura máxima son positivos, lo que indica que cuando éstas aumentan, también lo hace la excreción de STEC	101
Tabla 25: Estimaciones de los parámetros utilizando Máxima Verosimilitud. No hay relación entre las variables climáticas con la expresión de los genes que codifican a la Stx1	101
Tabla 26: Utilizando estimaciones de Máxima Verosimilitud, no se encontró relación de las temperaturas y las precipitaciones con la presencia de los genes que codifican la expresión de la Stx2	102

Tabla 27: Estimaciones de los parámetros utilizando Máxima Verosimilitud se encontró que la relación entre temperaturas y precipitaciones con la presencia de Stx12 es significativa	102
Tabla 28: Eventos de manejo que tienen efectos de estrés sobre los animales, que podrían predisponer la excreción de E. coli	103
Tabla 29: Se muestran los resultados de la identificación genética de las Stx, producidas por las STEC excretadas por los animales distribuidos en los corrales numerados del 1 al 18, durante el ensayo.	126
Tabla 30: Se muestran los resultados de la identificación genética de las Stx, producidas por las STEC excretadas por los animales distribuidos en los corrales numerados del 19 al 36, durante el ensayo	127
Tabla 31: Se exponen los animales excretores de STEC y la identificación genética del gen <i>rfbO</i> ₁₅₇ , responsable de la síntesis del antígenos somático O, el gen <i>eae</i> , que codifica para la proteína intimina y de las Stx, factores de toxicidad responsables de los daños celulares en los distintos órganos del hospedador	128

Índice de fotos

Foto 1: Distribución de los corrales. Cortina de árboles, calle y comederos sobre el sur. Pasillo para movimiento y manejo de los animales al norte. Puede apreciarse el declive del terreno, que permite el drenaje de los corrales hacia el norte	57
Foto 2: Caravana numerada de identificación individual, colocada en la oreja izquierda	58
Foto 3: La disposición del bebedero, compartido cada dos corrales	60
Foto 4: Caravana colocada en el pabellón derecho, para identificar el nivel de PB de la dieta a los que fueron sometidos los animales	61

Foto 5: Hisopado de la mucosa recto anal	69
Foto 6: Novillos identificados con caravana numerada en la oreja izquierda y en el pabellón derecho, botón numerado de seguridad y caravana de color indicando el nivel de PB de la dieta a los que fueron sometidos	125
Foto 7: Tubos Eppendorf en la placa concentradora de partículas (PCP) (DynaL MPC® - S Biotec – Magnetic Particle Concentrator for Microcentrifuge Tubes – Pro. N° 120.20) a la que se le agrega en la parte posterior la placa magnética, durante 5 minutos, para que las micro perlas que contienen el complejo antígeno –anticuerpo de E. coli, queden adheridas a la pared del tubo	129
Foto 8: Placa de Agar Sorbitol – McConkey Sorbitol + cefixima telurito (SMAC _{CT}) + suplemento MUG para seleccionar las colonias de E. coli O157:H7 que no fermentan este azúcar, que aparecen de color amarillo pajizo	129
Foto 9: Placa de Agar Sorbitol – McConkey Sorbitol (SMAC _{CT}) + cefixima telurito + suplemento MUG mostrando las colonias de E. coli que fermentan este azúcar y al complemento MUG, que aparecen de color rojizo y mostrando fluorescencia	130
Foto 10: Placa con crecimiento de colonias de E. coli O157:H7 y carta mostrando Reacción de aglutinación positiva (circulo 1) a la prueba de latex, confirmando presencia de E. coli O157:H7	130
Foto 11: Visualización de la reacción de PCR en medio de gel de agarosa) que permite detectar los genes de la región constante de intimina (eae), de las toxinas Shiga (Stx1 – Stx2 y del responsable de la síntesis del antígeno O (rfbO ₁₅₇))	131
Foto 12: Proceso de desollado de los animales en el sector sucio de la planta Frigorífica	131
Foto 13: Procesamiento de las muestras de esponjado de las medias reses para realizar la SIM y posterior cultivo selectivo en Agar Mac Conkey Sorbitol + cefixima telurito (SMAC _{CT}) + suplemento MUG, el análisis de aglutinación (Latex) y el repique en Agar Mac Conkey	132

Índice de diagramas

Diagrama 1: Diagrama de flujo para la identificación de muestras positivas	55
Diagrama 2: Distribución de los corrales utilizados para el ensayo	56
Diagrama 3: Flujo lineal, detallando la metodología para la extracción de ADN de las cepas de E. coli O157:H7, utilizando un kit comercial específico, (DNeasy® Blood & Tissue Handbook – Dneasy Blood & Tissue Kit), de las maestros previamente congeladas, al finalizar el proceso de aislamiento e identificación	76

Capítulo 1: Agente infeccioso

1.1.- Introducción

En este capítulo se aborda el estado del arte con referencia al patógeno *Escherichia coli* en general y en particular, una revisión sobre *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), que tiene capacidad de generar enfermedad. Se toma revista de las toxinas Shiga, principal factor de virulencia de EHEC, sus mecanismos de acción y la interacción con la mucosa intestinal.

1.2.- Generalidades de la *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Es una especie bacteriana habitual de la flora del colon de humanos y animales homeotermos; que ocasionalmente pueden ser patógenas [4].

En base a un esquema de clasificación serológica para las *E. coli*, se las tipifica de acuerdo a sus perfiles antigénicos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular) [1,2].

Entre las *E. coli* patógenas, existen diversos grupos que tienen la capacidad de generar enfermedad a través de un conjunto común de factores de virulencia. La interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos [2,4], constituyen lo que se denominan patotipos, siendo los más importantes: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC).

De acuerdo a una combinación específica de antígenos O y H, se define el serotipo de un aislamiento. Actualmente se reconocen 72 antígenos K (K1-K103) y 53 antígenos H (H1-H56).

El patotipo EHEC, y su serotipo modelo O157:H7, se define por la presencia de 3 factores: al menos un tipo de toxina Shiga, una isla de patogenicidad, denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement), y un plásmido de entre 92 y 104 kb (pO157) [3,5].

El serotipo EHEC de mayor relevancia para el humano a nivel mundial es O157:H7, mientras que para EPEC es O127:H6.

La habilidad de las cepas STEC para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para secretar las toxinas Shiga (Stx) y sus variantes, responsables del daño del endotelio

vascular en el ser humano [15]. Hasta el presente están descriptos los siguientes tipos: Stx1, Stx2, Stx2c, stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g y Stx2h, los que incluyen 25 variantes de genotipos de Stx [15].

Otro factor de virulencia es una proteína de membrana externa, llamada intimina, codificada por el gen *eae*, localizado en la membrana externa de la bacteria [19]. Este locus está asociado con la adherencia íntima de la bacteria al enterocito, la iniciación de las señales de transducción y la desorganización de las microvellosidades, con la formación de la lesión AE (attaching and effacing).

La presencia de LEE le confiere a las cepas STEC una mayor virulencia, pues los serotipos LEE positivos aparecen más comúnmente asociados a brotes de casos de SUH que los serotipos LEE negativos [14].

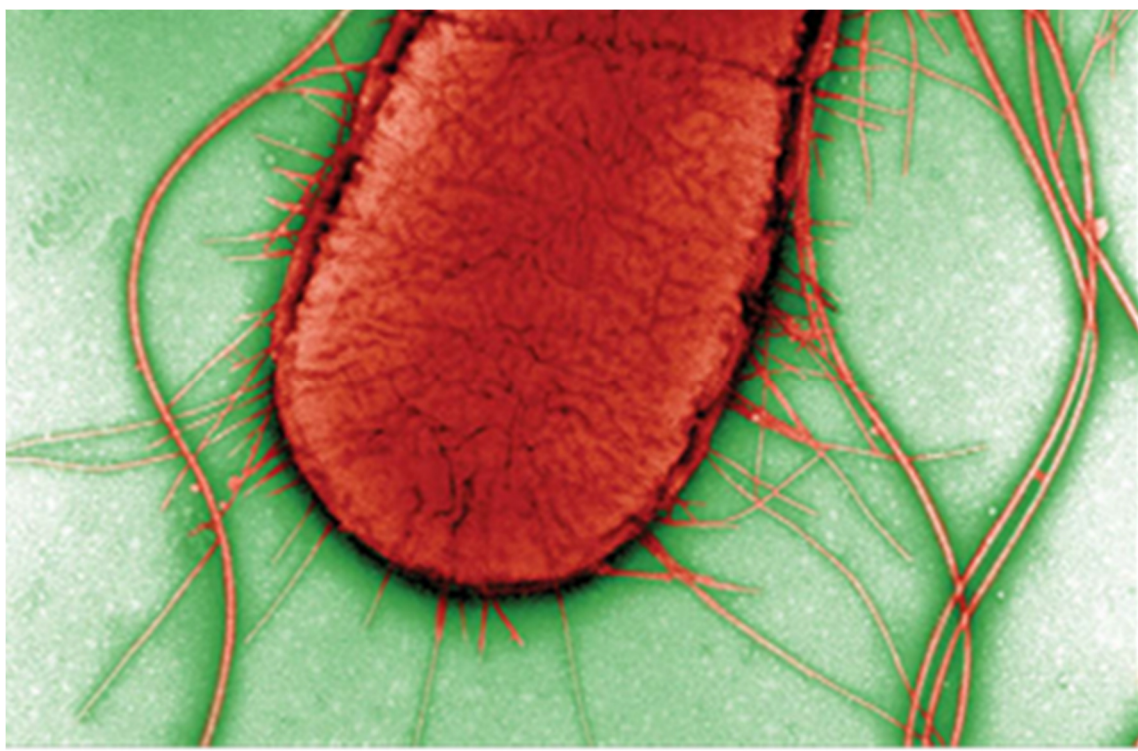


Fig. 1: Micrografía electrónica de E. coli O157:H7. (50000X). Tomado de H Pennington, 2010

La toxina Shiga, codificada por un bacteriófago, es el principal factor de virulencia de EHEC, existiendo dos grupos principales en la familia Stxs, la tipo 1 (Stx1) y la tipo 2 (Stx2).

Las dos principales isoformas, Stx1 y Stx2, a pesar de tener el 57% de secuencia genética idéntica, difieren drásticamente en potencia citotóxica. Los estudios epidemiológicos muestran

que la Stx2 está asociada con la enfermedad más severa, dado que esta variante es la responsable del mayor número de causas de muerte en seres humanos [107].

Las cepas STEC, son tanto productoras de Stx2, de Stx2+Stx1 o solamente de Stx1, siendo las que producen Stx2 las responsables de SUH con un mayor grado de compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC). Esto está íntimamente relacionado con que Stx2 tiene una capacidad citotóxica de 100 a 1000 veces superior que Stx1 [107].

1.3.- Descripción particular de la EHEC

Escherichia coli (E. coli) es una especie bacteriana habitual de la flora del colon de humanos y animales homeotermos. El primero en describir a este microorganismo fue el médico austro-alemán Theodor Escherich en 1885.

Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son muy versátiles fisiológicamente; ya que pueden crecer en medios que contengan glucosa como única fuente de carbono.

El principal antígeno de la pared celular de E. coli (Figura 2) es un lipopolisacárido (LPS), que está formado por tres componentes: el polisacárido somático O (externo), una región polisacárida central (compartida por todas las enterobacterias), y el lípido A del LPS.

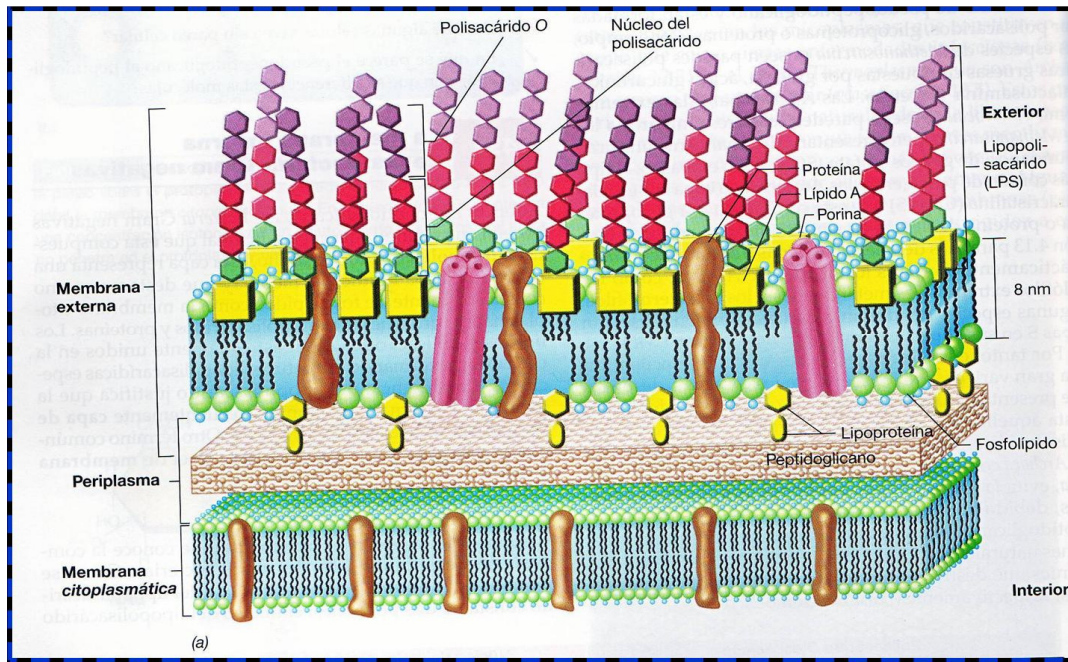


Figura 2: Principales componentes de la pared de la *E. coli*: En la parte inferior se puede apreciar la membrana citoplasmática, la que está recubierta por una pared de peptidoglicano y por fuera la membrana externa. Las figuras cuadradas amarillas, con colas de hexágonos, son los lipopolisacáridos <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/05pared.htm>

Antes de la identificación de factores de virulencia específicos en cepas de *E. coli* diarreagénicas, el análisis serotípico ha sido la metodología predominante por el cual se pudieron diferenciar cepas patógenas.

En 1944, Kauffman propuso un esquema de clasificación serológica para las *E. coli*, que todavía es utilizado, aunque en forma modificada. Según el esquema modificado de Kauffman, las *E. coli* son serotipados sobre la base de sus perfiles de antígenos de superficie O (somático), H (flagelar), y K (capsular). [1,2]

Los antígenos O definen un serogrupo, y en la actualidad se han reconocido un total de 173 antígenos O diferentes (O1-O181).

Una combinación específica de antígenos O y H define el serotipo de un aislamiento.

La presencia de antígenos K fue determinada originalmente por medio de pruebas de aglutinación bacteriana.

Actualmente se reconocen 72 antígenos K (K1-K103) y 53 antígenos H (H1-H56).

Algunos serotipos pueden ser asociados con ciertos síndromes clínicos, pero en general la presencia de determinado antígeno es insuficiente para identificar cepas virulentas. En su lugar, los serogrupos y los serotipos sirven para asociar marcadores cromosomales que se correlacionan con clones virulentos específicos. [3]

Hay más de 150 serotipos de EHEC que comparten el mismo potencial patogénico que O157:H7; los de mayor relevancia son: O26:H11, O103:H2, O104:H4, O111:H8, O145: H- y O157: NM (no móvil, ya que estas E. coli no poseen flagelo).

La E. coli se utiliza como indicador de contaminación fecal, debido a su abundancia en heces humanas y de animales; y puede ser fácilmente detectada por su capacidad de fermentar lactosa.

Aunque, debido a que las muestras pueden contener otras bacterias entéricas (que también fermentan lactosa) como Citrobacter, Klebsiella y Enterobacter, se acuñó el término “coliformes” para referirse a este grupo.

La detección y enumeración de coliformes se utiliza como indicador de calidad sanitaria del agua o como indicador general de condición sanitaria en el procesamiento de alimentos.

En general, estas bacterias son comensales y ocasionalmente pueden ser patógenas [4]. No obstante, existen diversos grupos, que tienen la capacidad de generar enfermedad, a través de un conjunto común de factores de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos [4], constituyendo lo que se denominan patotipos.

Siendo los patotipos más importantes: E. coli enteropatógeno (EPEC), E. coli enterohemorrágico (EHEC), E. coli enterotoxigénico (ETEC), E. coli enteroagregativo (EAEC), E. coli enteroinvasivo (EIEC), E. coli difusamente adherente (ECDA) [6] y E. coli patógeno extra-intestinal (ECEXP) [3].

Los seis primeros tipos, corresponden a patógenos intestinales y el último agrupa a los causantes de infecciones extra-intestinales [2].

1.4.- Las toxinas Shiga

Distintos serotipos de *E. coli* producen una o más toxinas de estructura proteica, las que están estrechamente relacionadas con la toxina Shiga (Stx) de un serotipo de *Shigella dysenteriae* [106].

Estas deben su nombre al microbiólogo japonés, Dr. Kiyoshi Shiga, quien fue el primero en describir el origen bacteriano de la disentería causada por *Shigella dysenteriae*, en 1897 [107].

La toxina Shiga, codificada por un bacteriófago, es el principal factor de virulencia de EHEC. Existen dos grupos principales en la familia de Stx, la Stx1 y la Stx2, que fueron descubiertas en el año 1977, al observar que ciertas cepas de EPEC, aisladas de pacientes con enteritis, producían una toxina diferente y eran capaces de provocar una lesión intensa e irreversible sobre la línea celular Vero (línea celular derivada de riñón del mono verde africano, *Cercopithecus aethiopicus*), por lo que fueron llamadas verotoxinas (Vtx) [107].

Se debe aclarar que existen dos expresiones para denominar a estas toxinas, pero se ha confirmado que, tanto la Stx como la Vtx producidas por la *E. coli*, como por otras bacterias entéricas, son las mismas entidades [108].

Toda la familia de toxinas Shiga, son toxinas del tipo AB5, compuestas por una subunidad A catalíticamente activa y un pentámero de 5 subunidades B, que les permiten entrar a las células blanco que poseen el receptor específico. La proteína necesita estar conformada por la unidad A y las unidades B, para ser activa y poder entrar en las células e inhibir la síntesis de proteínas.

El origen más común de las toxinas Shiga son las bacterias *S. dysenteriae* y el grupo Shigatoxigénico de *E. coli*, el cual incluye el serotipo O157:H7 y otras cepas de *E. coli* enterohemorrágicas [106,107].

Las diferentes cepas bacterianas pueden producir diferentes cantidades de Stx1, Stx2. Las cepas de STEC que expresan Stx2 únicamente, son más virulentas que las cepas que expresan Stx1 solamente o Stx12.

Tanto Stx1 como Stx2 tienen una estructura similar, pero ambas son inmunológicamente diferentes. Los anticuerpos contra Stx1 no neutralizan Stx2 y viceversa [107,108].

1.5.- Acción de las toxinas Shiga

Los dos tipos de toxina Shiga, Stx1 y Stx2 poseen la misma estructura AB₅, en donde la subunidad A (StxA) se encuentra asociada con 5 subunidades B (Stx₂B). La subunidad A es la que tiene la actividad catalítica N-glicosidasa. Actúa quitando una base específica de adenina de la subunidad 28S rRNA de la subunidad 60S de las células infectadas.

Como la base de adenina está en un loop (rulo-espiral) de rRNA de las células, es esencial para el pegado correcto de factores de elongación, por lo que la toxina es capaz de interrumpir la síntesis de proteínas de la célula blanco. Las subunidades A de Stx1 y Stx2 son casi idénticas, difiriendo solamente en 1 aminoácido (el aminoácido Serina, en la posición 45, que es reemplazado por treonina). Sin embargo, en contraste con la secuencia de las subunidades A, las subunidades B de Stx1 y Stx2 sólo tienen un 55% de semejanza [2, 6,106,107,108].

1.6.- Diferencias entre Stx1 y Stx2

Las dos principales isoformas, Stx1 y Stx2, a pesar de tener el 57% de secuencia idéntica, difieren drásticamente en potencia citotóxica. Los estudios animales y epidemiológicos muestran que Stx2 está asociada con la enfermedad más severa, dado que esta variante es la responsable de la del mayor número de causas de muerte [107].

Como se dijo anteriormente, de todas las cepas STEC (tanto productoras de Stx2, de Stx₁₂ o solamente de Stx1), las cepas de E. coli que producen Stx2 son las responsables del SUH con un mayor grado de compromiso con el Sistema Nervioso Central (SNC). Esto está íntimamente relacionado con que Stx2 tiene una capacidad citotóxica de 100 a 1000 veces superior que Stx1 [107].

Además, algunas variantes de Stx2 son más virulentas en humanos, como Stx_{2c} y ciertas formas de Stx_{2d}, que pueden ser activadas por la elastasa, presente en el mucus humano.

Si bien las infecciones por STEC están asociadas a Stx1, Stx2 o ambas, la presencia de Stx2 aumenta considerablemente el riesgo de SUH [6,106,107,108] ; debido a que existe una diferencia de estabilidad entre los pentámeros de subunidades B de ambas toxinas, que son los responsables de la unión de la toxina a las células.

Capítulo 2: Patogenia y epidemiología de la enfermedad

2.1.- Introducción

En este capítulo se aborda la evolución de la intensificación de los sistemas agropecuarios y su relación con los procesos de transformación del sistema de producción de carne.

Se describen la patogenia y la epidemiología de la enfermedad tanto en los seres humanos como en los animales y se plantean los riesgos epidemiológicos para el hombre.

Finalmente, se presenta la justificación y pertinencia temática para abordar este tema y se argumenta sobre los efectos de la presencia de la E. coli O157:H7 en alimentos y sus consecuencias sobre el comercio de carnes.

2.2.- Generalidades

Durante las últimas décadas del siglo XX, cuando se planteaban los posibles desafíos que la salud pública debería asumir en el siglo venidero, las enfermedades como el cáncer, el sida o los accidentes cardiovasculares aparecían como los grandes problemas contra los que luchar. Por su parte, el desarrollo alcanzado en la especificidad de las antibiótico-terapias contra las enfermedades infecciosas, hicieron pensar que las infecciones bacterianas serían un problema, a lo sumo, menor [58, 77, 78,79].

La creciente aparición y diseminación de estirpes bacterianas virulentas y de mecanismos de resistencia frente a los antibióticos disponibles [54], asociados a la intensificación de los sistemas de producción, los “*feedlots*”, sistema de encierro de animales en corrales, donde reciben su alimento en comederos [56,57,104], han hecho que las enfermedades infecciosas vuelvan a tener vigencia, implicando un nuevo desafío para los organismos de salud [53,55].

La evidencia epidemiológica reciente [61,77,80,81,82,93] indica que la humanidad se encuentra frente una situación, ante la cual es prioritaria la optimización de la lucha

contra las enfermedades infecciosas emergentes [63,81], producto de la intensificación de los sistemas agropecuarios.

Esta intensificación tiene su inicio en la Argentina, a partir de las últimas tres décadas del siglo pasado, como consecuencia de la introducción del cultivo de soja [66,96,97,98,99,100].

Por esta razón, en las regiones con aptitud agrícola, la ganadería pasó, en algunos casos, a compartir el suelo con la agricultura, en rotaciones que le aseguran sustentabilidad a los sistemas productivos [101]. En otros, ha sido desalojada, generando el confinamiento de los animales de recría y terminación en corrales de encierre, de distinta duración [65,66].

En la actualidad, el 20% de los animales faenados anualmente en nuestro país, provienen de sistemas de engorde a corral o feedlot, basados en la alimentación con granos de cereales y/o silaje de maíz [66,96,100,104].

Como consecuencia de este proceso de transformación, la alimentación intensiva de bovinos con encierres temporarios, ha crecido en todo el país [65,66]. Esta actividad se ha ido adaptando a las necesidades de producción, en muchos casos en forma desordenada [66,67]. Esta concentración de animales genera un aumento de producción de carne por unidad de superficie, pero a su vez, provoca problemas de contaminación ambiental, con el consecuente riesgo sanitario, tanto para los animales como para la salud pública [67].

Este nuevo contexto obliga a incorporar nuevas herramientas y repensar los procesos de producción. En este sentido, las exigencias del mercado están ejerciendo presión sobre la cadena, desde los frigoríficos hacia atrás, involucrando tanto al mercado local como al internacional. Se considera que el control de la E. coli O157:H7 en el ganado bovino debe empezar dentro del establecimiento productor, para disminuir la incidencia de la infección en el hombre [37].

Esta circunstancia está requiriendo buscar nuevos modos de encarar la actividad pecuaria: la ganadería de precisión y por ambientes [101], esto es, repensar sus ingenierías de procesos, de alimentación, de manejo, genéticas y sanitarias, que conlleven a un proceso de evolución, en el cual, el concepto de sanidad animal esté directamente ligado a la salud pública [65,66].

La aparición de enfermedades infecciosas emergentes, específicamente aquellas que se transmiten a través de los alimentos (ETA), implica tomar conciencia sobre los riesgos potenciales que generan, especialmente en los países en desarrollo [83,84,85].

La transformación del sistema de producción de carne en la Argentina, obliga a tomar debida cuenta de los riesgos sanitarios que ello acarrea para la salud pública, ya que el consumo de carne vacuna por habitante, es el más alto del mundo. Situación que incrementa los riesgos de la población a padecer ETA [37,65,66].

Por tal motivo, se requiere trabajar en el perfeccionamiento de las técnicas de diagnóstico, tanto en el nivel de especificidad, como en la sensibilidad y rapidez en la detección de agentes infecciosos y de sus genes de virulencia. Ello permitirá ejecutar programas adecuados de prevención y tratamiento de estas enfermedades.

2.3.- Patogenia de la enfermedad en el hombre

La bacteria *E. coli*, que figura como una especie bacteriana predominante entre la flora normal del aparato digestivo del hombre y de los animales [77,80,93], tiene distintas cepas virulentas, como la *E. coli* O157:H7, que colonizan el tracto gastrointestinal (TGI) de los animales, sin causarles lesiones [95], pero están identificadas como patógenos capaces de causar un amplio rango de enfermedades al ser humano, porque presentan una alta capacidad de dispersión a través de la cadena alimentaria [77].

La transmisión de EHEC al ser humano puede darse en forma directa, a través de una amplia variedad de productos cárnicos o lácteos, o indirecta, vía la excreción fecal en el medio ambiente, conduciendo a la contaminación de otros productos o de las fuentes de agua (Yoon y Hovde, 2008). También puede ser transmitida de persona a persona; pero la ingestión de carne picada vacuna mal cocida, comúnmente en forma de hamburguesa, sigue siendo el principal vehículo de infección [77].

Sin embargo, el consumo de vegetales crudos contaminados por EHEC, también han sido responsables de varios brotes, con alto número de infectados en otros países [59,60,61].

Los efectos de las infecciones de EHEC en humanos, se manifiestan en un rango muy variable, que van desde pacientes asintomáticos hasta casos fatales. En niños, la EHEC causa diarrea, colitis hemorrágica y SUH [59].

E. coli O157:H7 es el serotipo mundialmente reconocido como el causante de la mayoría de los grandes brotes y casos aislados de colitis hemorrágica y SUH; siendo etiológicamente en la Argentina, el responsable del 85% de los casos de SUH [7].

Aunque no es el único serotipo asociado a enfermedad severa en el hombre, ya que también poseen potencial patogénico similar otros serotipos, conocidos como no-O157, tales como: O2:H11, O8:H19, O15:H27, O25:H-, O26:H11, O58:H40, O91:H7, O111:H-, O103:H2, O103:H25, O113:H21, O104:H4, O121:H19, O145:H-O145:H25, O171:H2, y O174:H21 [11,12].

Las características típicas de la gastroenteritis causada por E. coli O157:H7 están dadas por intenso dolor abdominal, diarrea no sanguinolenta, que progresa a sanguinolenta después de 1 a 4 días, con ausencia de fiebre [10].

El SUH es una entidad clínica y anatomopatológicamente caracterizada por presentación aguda de daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar a otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central.

2.4.- Patogenia de la enfermedad en los animales

Un paso clave para abordar las acciones preventivas en salud pública, es saber cómo y donde persiste la bacteria en los bovinos. Hasta ahora se había descrito la presencia de la E. coli O157:H7 dentro del TGI, con una afinidad por el intestino grueso [64,65,66,72].

Utilizando tanto infección experimental de terneros como animales jóvenes, provenientes de rodeos comerciales [63], se evidenció que en algunos de esta categoría, el mayor número de bacterias se encontraba en la materia fecal [93,90].

Consecuentemente, los rastreos del contenido del lumen del TGI en busca de los microorganismos, arrojaban resultados negativos o se encontraban concentraciones significativamente bajas [91,92].

La necropsia de dichos animales permitió observar una asociación de adherencia entre el tejido y la bacteria, en la zona comprendida alrededor del pliegue recto – anal (PRA) [65,66,92].

Este tejido, elegido por la E. coli O157:H7, estaba caracterizado por poseer una alta densidad de folículos linfoides, lo que permite la persistencia de la bacteria en ese lugar, favoreciendo la existencia de animales súper excretores.

Observaciones posteriores, utilizando un microscopio de inmunofluorescencia, detectaron micro colonias de E. coli en el epitelio de ese sitio [66,92].

Trabajos realizados recientemente [91,92] determinaron que algunas cepas enteropatógenas y en particular cepas de EHEC pueden llevar un locus de patogenicidad específico, que afecta a las células de la mucosa epitelial de la zona recto - anal, mediante una adhesina bacteriana, que les permite adherirse a los receptores de los enterocitos de los bovinos huésped, específicamente localizados entre 3 a 5 cm de la apertura anal.

La alta concentración de folículos linfoides favorecería la interacción entre las bacterias y las células de los animales [91,92].

Las mismas experiencias reportaron que las bacterias con esa ubicación específica (EHEC), estaban predominantemente presentes en la superficie de la boñiga fecal de los animales estudiados.

En contraste con otros serotipos de E. coli, presentes en niveles consistentes, a lo largo del intestino grueso, su ubicación y concentración en las boñigas estaba equitativamente distribuida.

Adicionalmente, componentes intrínsecos a los animales, asociados a factores patogénicos y ambientales, ayudarían a la colonización del recto terminal por parte de la E. coli O157:H7, estableciendo así la existencia de súper excretores [64].

A su vez, se demostró, mediante estudios experimentales [66] y de campo de larga duración [64,65], que el subgrupo de animales con la mucosa epitelial colonizada por E. coli O157:H7, estaba asociado a elevados niveles de excreción durante semanas y meses. Mientras que los animales, en los cuales las bacterias están presentes en el TGI y con el recto no colonizado, excretaban bacterias solo por un par de días [64,88].

Por la naturaleza del confinamiento, se presume que la presencia de súper excretores en sistemas de alta concentración de animales aumentaría la contaminación del ambiente a través de las heces.

Dada la capacidad de sobrevivencia de la E. coli O157:H7 por largos períodos en el ambiente [104], el riesgo de infección de otros animales genera una mayor probabilidad de contaminación de las canales en mataderos y frigoríficos [63,64,68,69,70,71].

2.5.- Epidemiología de la enfermedad en el ser humano

La E. coli O157:H7 fue reconocida como patógeno humano por primera vez, a partir de dos casos de diarrea hemorrágica, ocurridos en Oregon y Michigan, EEUU en 1982 [77], después de comer hamburguesas. A partir de ese momento es considerada como ETA, destacándose la participación de la carne y subproductos cárnicos, jamón y salames; como así también aguas contaminadas, leche, yogur y jugo de manzanas sin pasteurizar, entre otros [58,59,60,61,62,86].

Las STEC están identificadas como patógenos capaces de causar un amplio rango de enfermedades al ser humano, porque presentan una alta capacidad de dispersión a través de la cadena alimentaria [77]; pudiendo causar distintos síndromes diarreicos y enfermedades severas; incluso mortales, cuando son ingeridas por los seres humanos a través de los alimentos contaminados [59,61,77,80,93,95].

Los primeros casos de SUH en Argentina fueron estudiados por el Dr. Carlos Giannantonio en la década del 60 [104] y hoy es considerada una enfermedad endémica [63], registrándose una incidencia de entre 7 y 10 veces mayor que en las zonas de mayor riesgo en el mundo, afectando a niños de entre 6 meses a 6 años de edad [60,62].

En el año 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó en la Argentina 450 casos [60,61]; y para el año 2005 el registro ascendía a 13,9 casos cada 100.000 niños menores de 5 años [61,62].

Esta enfermedad, en niños menores de 6 años, requiere internación, por el compromiso renal que implica, con la necesidad de tratamientos de diálisis y en casos graves, trasplante renal.

La etapa aguda puede derivar en la muerte, debido al serio compromiso del sistema nervioso central de los menores [87].

Por tal motivo, en abril de 2000, por Resolución N° 346/00, el Ministerio de Salud de la República Argentina, estableció la notificación obligatoria del SUH al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

El SUH constituye en la Argentina, la primera causa de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica en pediatría, siendo responsable del 20% de los trasplantes renales en niños que han padecido el síndrome [93,60].

En particular, la información recogida de la Unidad Centinela SUH (UC SUH), sistema de vigilancia que monitorea la tendencia de la enfermedad en la provincia de La Pampa, indica que esta es una de las provincias Argentinas que registra mayor prevalencia de SUH [157,159].

La UC SUH del Hospital Lucio Molas, de la ciudad de Santa Rosa, informó que de los 63 casos registrados, en el periodo 2005 – 2013, la mayor incidencia de la enfermedad se registró durante los meses cálidos, con pico en junio y julio, afectando a niños de 31 meses de edad promedio, con una letalidad del 7% [157,159]. (Ver Cap. 10: Anexos, gráfico 13)

Con respecto al análisis de los datos de laboratorio, de los casos registrados en la UC SUH, se observa que la Stx2, portada por las E. coli O157:H7 aisladas, es el factor de virulencia responsable del mayor número de niños afectados [157]. (Ver Cap. 10: Anexos, gráfico 14, 15)

Es de hacer notar que, debido al avance en el manejo clínico temprano y los tratamientos en la fase aguda de la enfermedad, se ha logrado, en los últimos años, descender del 27% a menos del 5% el índice de mortalidad [60,87].

2.6.- Epidemiología de la enfermedad en animales y factores de riesgo para el ser humano

Para el presente trabajo, se detectaron fuentes informativas [63,68,64,88,94] sobre los factores contaminantes, que favorecen el desarrollo y la incidencia de la E. coli O157:H7 en las circunstancias actuales.

Durante la década pasada, estudios realizados en Escocia demostraron que el 20% de los animales de las granjas estudiadas estaban infectados con E. coli O157:H7 y que a su vez, algunos animales se comportaban como súper excretores, porque excretaban mucho más bacterias que otros bovinos, lo que tiene implicancia en la dinámica de la transmisión de la E. coli en los animales y el riesgo de infección en el ser humano [7,31,64].

Estudios de campo mostraron que el 75% de las muestras de materia fecal de ganado de carne positivas a E. coli O157:H7, contenían $<10^2$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de excretas. En contraste, se detectaron unos pocos animales que excretaron E. coli con niveles superiores a $>10^7$ de UFC por gramo de materia fecal. El 9% de bovinos de carne fueron responsables de más del 96% de toda la excreción de E. coli O157 [14,15].

Esta situación se agrava, como consecuencia del crecimiento de los sistemas de engorde a corral, ya que por la naturaleza del confinamiento, se presume que la presencia de excretos en sistemas de alta concentración de animales, aumentaría el riesgo de infección de otros y la mayor probabilidad de contaminación de las carcasas en mataderos y frigoríficos [72].

La alta densidad de animales en los corrales, obliga a éstos a echarse sobre sus propias deposiciones, aumentando el riesgo de contaminación de la piel, por la presencia de E. coli O157:H7 en las costras de materia fecal adheridas en los pelos de la parte ventral y los flancos, con la consecuente probabilidad de contaminación de las medias reses en los mataderos y frigoríficos [63,64,68,69,70,71,132].

Recientes trabajos indican que hay una correlación entre animales excretores de E. coli O157:H7 y la frecuencia de canales contaminadas y que la carga de E. coli en las canales se correlaciona con la concentración de E. coli en la piel de los bovinos [37,64,72].

Esto demuestra el efecto de la transferencia bacteriana de la piel del animal a la canal, durante el desollado. Por cuanto, la probabilidad de encontrar una carcasa contaminada con E. coli después del cuereado en el frigorífico, sería 1,5 veces mayor en aquellas provenientes de animales engordados a corral, que de los provenientes del sistema de pastoreo [63,72].

En la Argentina, como consecuencia de la adaptación a los nuevos escenarios de producción, la adopción de la alimentación intensiva de bovinos en sistemas de encierre, ha ido creciendo y tenderá a mantenerse en el futuro próximo [35,36,102].

Por lo expresado hasta ahora, se puede decir que los animales excretores de E. coli O157:H7 adquieren importancia epidemiológica, por ello que es importante el conocimiento de la dinámica de su excreción, durante el ciclo de recría, engorde y terminación, para contribuir a entender mejor la contaminación de las carcasas y a proyectar futuras medidas, para garantizar la seguridad en la cadena alimentaria, disminuyendo la incidencia de la enfermedad y por ende una merma en la morbi - mortalidad infantil por esta causa. [64,65,66,67,73,74,104].

2.7.- Estudios longitudinales y transversales de STEC en bovinos

En el 100% de los rodeos analizados en Canadá, los terneros recién destetados estaban expuestos a STEC y el 83% excretaban antes de su llegada a los corrales de engorde [135].

Estudios realizados en España, indicaron que el 95% de las granjas examinadas estaban contaminadas con STEC; dentro de ellas el 37% de los terneros y el 27% de las vacas dieron resultados positivos [7,31,32].

Los novillos de la principal zona productora de carne vacuna de la Argentina son un importante reservorio de STEC O157:H7 [35,46]. Se determinó que sobre 373 novillos (46%), 198 vacas (24%), 136 novillitos (17%), 57 vaquillonas (7%) y 47 terneros (6%),

previo a la faena, en distintos frigoríficos, la prevalencia de *E. coli* O157 era del 10,5 % en los terneros, del 8,5% en las vaquillonas, 5,1% para los novillitos, 3,5% para los novillos y 1,5 % para las vacas que ingresaron a faena [142].

En distintos tambos del estado de Washington, se reportó una considerable variabilidad en la excreción de STEC O157:H7 [134]. De 56 animales positivos (5,13%) sobre 1091 muestreados, 35 (3,20%) excretaron una única vez, 12 (1,09%) repitieron la excreción en 2 oportunidades, de los cuales, 11 en forma consecutiva. Siete vacas (0,64%) excretaron en 3 oportunidades, 1 vaca (0,09%) excretó STEC 4 veces y 1 animal (0,09%) eliminó STEC en 5 oportunidades, estos últimos con resultados positivos intercalados entre resultados negativos. En algunos tambos, la frecuencia de la excreción de STEC fue relativamente alta en contraposición con otros, en los cuales no se aisló STEC. No obstante, la condición de los tambos con baja prevalencia de STEC durante un periodo prolongado de tiempo, podía cambiar repentinamente [134].

En un seguimiento realizado durante 11 meses, en 10 granjas del Reino Unido, a un promedio de 90 animales por establecimiento, menores de 24 meses, se aisló STEC O157 en el 7,7% de 6266 muestras, con una variación del 0,4 al 17,9%. Se identificó la presencia de 361 animales (26,1 %) excretando STEC O157 sobre 1383 muestreados, con una variación del 1,9 al 48,5 % entre las distintas granjas analizadas. Un total de 269 animales (19,45%) resultaron positivos a STEC una sola vez, 67 animales (4,84%) excretando STEC dos veces, 22 animales (1,59 %) excretaron STEC 3 veces, 3 animales (0,21 %) excretando STEC en 4 oportunidades. Por otra parte se determinó una relativamente baja probabilidad que un animal positivo en un muestreo, volviera a excretar un mes más tarde, siendo un evento relativamente transitorio, con una duración de 1 mes [138].

En un seguimiento del comportamiento de la excreción de *E. coli* O157:H7 en rodeos de cría, sobre sistemas pastoriles, en el estado de Kansas, EEUU, los resultados de los muestreos de vacas y terneros, durante un año, arrojaron resultados de prevalencia bajos (1,3%). No se identificaron animales excretando STEC en más de una ocasión y la probabilidad que un animal positivo en un muestreo volviera a excretar un mes más tarde, fue baja [82].

Los reportes de Canadá en un feedlot de 75000 animales [139], dispuestos en corrales de a 500, indicaron una prevalencia del 7,4% de STEC al destete y el 15% en el primer muestreo, obtenido 7 días después del arribo de los animales a las instalaciones, encontrando que en todos los corrales había por lo menos, 1 o más animales positivos.

La prevalencia de E. coli O157 en los terneros de un feedlot Canadiense, con capacidad para 2000 animales, se mantuvo estable a lo largo del ensayo, registrándose valores del 36,7% al inicio y 30,8% dos meses después, concluyéndose que las cepas introducidas por los animales, al ingresar a los corrales, terminan contaminando y persisten en el medio ambiente, contagiando a otros animales [136].

Sobre 2164 muestras y 1262 animales muestreados (830 vacas y 432 terneros) analizadas en tambos de Holanda, la excreción de E. coli O157:H7 fue intermitente en los animales infectados, con mayor prevalencia en otoño y menor en invierno [123].

Los índices estacionales en la excreción de E. coli O157:H7 en vacas lecheras del estado de Washington, fueron elevados durante el verano y el otoño, separados por períodos de baja excreción durante el invierno y la primavera [134].

Reportes Canadienses registran una prevalencia de STEC mayor, durante los meses de verano, siendo baja o nula en los meses de invierno [145].

Otras revisiones bibliográficas indican que existen picos de prevalencia estacionales de STEC en verano, como consecuencia de la mayor cantidad de horas luz diurna, lo que favorecería la capacidad de multiplicación de la bacteria en los animales, ayudando a la sobrevivencia del agente patógeno en el ambiente; y por ende, colaborando en la transmisión. Coincidentemente se registró mayor cantidad de brotes de SUH durante estos picos de verano [68,124,139,144,145,146].

Contradictoriamente, la prevalencia de STEC en bovinos de carne en Escocia fue más elevada en la estación invernal (20%) y del 8,7% en el verano [41].

En Argentina observaron una mayor prevalencia de STEC en terneros de tambo en épocas cálidas [125,150].

2.8.- Factores nutricionales que influyen en la excreción de STEC

Se reportan episodios de excreción de corta duración y reinfección de STEC en un rodeo de carne, del estado de Ohio, los que pudieron obedecer a factores ambientales o nutricionales, como consecuencia de una disminución transitoria de la resistencia de los animales a la colonización de STEC [139].

En Canadá se informó que el incremento de la concentración de grano en la dieta, que fue en aumento durante el primer mes de encierre, pudo contribuir a acrecentar la susceptibilidad de los animales a la infección y a incrementar la excreción de E coli O157:H7 durante los primeras 4 semanas de encierre. Cuando la concentración de grano de la dieta se estabilizó, se notó también que la prevalencia de excreción de STEC se estabilizó en un nivel más bajo [69,139].

El estrés pos destete y el cambio de dieta en terneros, incidió sobre una alta prevalencia de STEC, debido a que esos factores favorecieron una mejor colonización del TGI de los animales. [150]

En un estudio comparativo sobre el comportamiento de la excreción de la E. coli O157:H7 en novillos encerrados en 15 corrales (300 a 500 por corral), alimentados con una ración a base de grano de cebada, con otros, alimentados en base a grano de maíz, se determinó que la prevalencia de STEC fue del 2,4% en los alimentados con cebada y del 1,3% en el ganado alimentado con maíz, determinándose que esta diferencia pudo estar dada por el Ph de la materia fecal, que en el caso de la dieta a base de maíz era más bajo [151].

La evaluación de los efectos de una alimentación a base de maíz húmedo con otra a base de maíz entero seco, suplementados con dos aditivos nutricionales distintos, sobre la excreción de E. coli O157:H7, en 168 novillos cruza Angus, encerrados en 24 corrales, determinó que los alimentados con maíz entero presentaron una prevalencia mayor que los animales alimentados con maíz húmedo; sin embargo, estas diferencias obedecieron al tipo de aditivo utilizado [152].

En un trabajo sobre el seguimiento del comportamiento de la excreción de la STEC en el ganado bovino de carne en la Argentina, se observó una disminución de animales excretando E. coli O157:H7 al pasar abruptamente de consumir una dieta a base de grano de maíz a un pastoreo directo a campo [129].

Los resultados de los análisis realizados en frigoríficos argentinos a novillos de 14 a 16 meses de edad, alimentados a base a granos, determinaron que el 39% de los animales excretaban STEC y que ello se debía al factor alimenticio [63].

Otro reporte indica que, si bien la composición de la dieta tiene incidencia en la excreción y prevalencia de la E. coli O157:H7 en los bovinos, los mecanismos específicos

responsables del aumento o disminución de la excreción, aún no se conocen muy bien, sosteniendo que pueden obedecer a cambios en la bioecología del intestino grueso, inducida por la variedad de ingredientes que se utilizan para la formulación de las dietas [153].

2.9.- Presencia de los factores de virulencia Stx

En un trabajo realizado en España, sobre bovinos de carne en engorde, el 20% de los aislamientos de STEC portaban los genes para Stx1, el 54% poseía los genes que codificaban a la Stx2 y el 26% portaban los genes para la expresión de la Stx12. El gen **eae** y el de la Stx2, para el serotipo de la E. coli O157:H7, fueron los hallazgos más comunes, seguidos de los genes **eae** y Stx1, y a su vez la presencia del gen **eae** fue significativamente mayor entre cepas portadoras del gen Stx1, aisladas en terneros y el gen para Stx2 predominó en los aislamientos de STEC de los animales de mayor edad [32].

Por otro lado, los trabajos Canadienses realizados en un feedlot de 75000 animales, indicaron que las STEC aisladas, portaban los genes para la codificación de Stx12 en el 83% de las muestras, mientras que los genes para Stx2 se diagnosticaron en el 16% y solo el 0,43% para los genes de Stx1 [139].

En un seguimiento del comportamiento estacional de la STEC en vacas de tambos, realizado en Argentina, se comprobó un aumento de las cepas portadoras del gen Stx12 y una disminución de las Stx1 en estaciones cálidas, manteniéndose estable la presencia cepas portadoras del gen Stx2 en todas las estaciones del año [147,150].

Estudios en Tandil, Argentina, establecieron que las vacas adultas de tambos se comportaban como reservorio de STEC, encontrando el gen de la Stx2 en 51 de las 86 cepas aisladas (59,3%). Por otro lado, el 7% de las STEC llevaban el gen **eae** y únicamente en 4 de las 86 STEC aisladas, se identificó la presencia de los genes para la expresión de los factores de virulencia para Stx1 y **eae** [104].

En un seguimiento de 3 años a 244 bovinos de carne en pastoreo, de un establecimiento ganadero de la región Pampeana, la presencia del gen **eae** de la región constante de Intimina se manifestó con mayor frecuencia en terneros (20/26) que en bovinos adultos (1/39) [46].

En la Argentina se informaron prevalencias del 20% para la presencia del gen que codifica la expresión de la Stx2, 9% para el gen Stx1 y 4% para los genes de Stx12, sobre 126 terneros y 118 vacas lecheras, indicando que los hallazgos del gen Stx2, son más comunes en animales de mayor edad [125].

2.10.- Relación de los factores ambientales con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga

Respecto a la incidencia de los factores ambientales, como el estrés pos destete, el transporte, el manejo dentro de las instalaciones, vacunaciones; y otras causas de estrés, incluidas las condiciones de los corrales de engorde, el barro y el exceso de humedad, como las condiciones secas y polvorientas, están mencionados como factores que pueden actuar como causa predisponente para la excreción de STEC O157:H7 en los terneros que ingresan al feedlot; favorecer su transmisión y mantener la prevalencia en los animales. [125,136,138,145,147].

En feedlots, los factores de estrés ambiental y nutricional, como los cambios de dieta, disminuyen la resistencia transitoria de los animales a la colonización de STEC, provocando la excreción por cortos periodos de tiempo, por lo que la eliminación de estos factores podría disminuir sustancialmente la exposición del hombre a este agente infeccioso [139,145,147].

El estrés pos destete, conjuntamente con cambios en la dieta, provocaría un menor desarrollo del sistema inmunológico y cambios anatómicos y fisiológicos del TGI de los terneros de tambo, lo que favorecería una mejor colonización del TGI por parte de la STEC, explicando la alta prevalencia [150].

2.11.- Temperatura y lluvia como factores predisponentes para la excreción de STEC

Debido al cambio climático, se aguarda un aumento de la temperatura de 2° a 5°C y un incremento de las precipitaciones en las regiones tropicales y en invierno, en las latitudes medias septentrionales y una disminución en otras, para fines del siglo XXI. Además, se prevé un aumento del número de fenómenos de precipitación extrema,

incluso en zonas con precipitaciones decrecientes. Se espera que esta situación afecte a las fuentes y vías de contaminación de *E. coli* O157:H7, aumentando las ETA en los seres humanos, asociadas al consumo de alimentos cárnicos y verduras crudas contaminados, como contacto directo con animales o MF [156].

Varios autores hacen referencias y concuerdan en que las estaciones del año influyen sobre la excreción de STEC. En general citan una mayor prevalencia en las épocas cálidas y lluviosas (primavera-verano) y menor en invierno. Sin embargo, en ninguno de los trabajos consultados se correlacionan los registros de temperatura y precipitaciones con la excreción de *E. coli* O157:H7.

Respecto a la influencia estacional como factor predisponente para la excreción de STEC O157:H7, se comprobó en un feedlot de Kansas, que 16/319 terneros (5%) destetados en setiembre (otoño), previo a la entrada a los corrales, provenientes de pasturas, fueron positivos a la *E. coli* O157:H7 [143].

Una revisión sistémica sobre la prevalencia de *E. coli* O157 en diferentes categorías de animales y en diferentes estaciones del año, en EEUU, informa que en el verano, la prevalencia de STEC O157 era de 10,68% en animales jóvenes, 4,65% en bovinos adultos y 1,79% en vacas lecheras y en invierno era del 9,17% para los animales jóvenes y para los vacunos adultos de 4,21%, mientras que en vacas lecheras fue del 0,36% [144].

Un trabajo realizado en los estados del norte de EEUU, que limitan con el sur de Canadá, otro en el medio oeste y el tercero en los estados del sur, limitando con México, reportaron niveles de prevalencia más altos en el verano y niveles bajos o indetectables en el invierno, encontrando una correlación positiva entre la longitud del día y la temperatura ambiente como factor predisponente para la excreción de *E. coli* O157: H7 en bovinos de carne [154].

En un trabajo de análisis de correlación revela una alta asociación entre la duración del día y la prevalencia de *E. coli* O157:H7, mientras que es menor entre la temperatura y la prevalencia [124].

Los picos de prevalencia de STEC O157 en bovinos de carne jóvenes, en Gran Bretaña, ocurrieron durante la primavera y en otros en el verano, destacando que los patrones

estacionales de excreción no guardaban relación con reportes de otros países europeos [138].

2.-12.- Relación del peso de los animales con la excreción de STEC

Con respecto a la edad y al peso de los animales, estos factores actuaron como desencadenantes de la excreción de STEC en bovinos de carne en Canadá. Los terneros excretaron más que los novillos, estableciéndose que los animales con pesos inferiores a los 317 kg mostraron mayor índice de excreción [69].

2.13.- Presencia de la E. coli O157:H7 en productos alimenticios

Reportes recientes indican una correlación entre animales portadores de E. coli O157:H7 y la frecuencia de canales contaminadas [37,64,72].

Trabajos de diagnóstico realizados en frigoríficos argentinos, indagando la presencia de E. coli O157:H7 en medias reses, determinaron una baja prevalencia de STEC portando los factores de toxicidad Shiga [7,12,14,31,51,53,58,62].

En un relevamiento efectuado en la provincia de Tucumán, se reportó que en solo 1/216 esponjados de medias reses, realizados en 6 frigoríficos, se recuperó E. coli O157:H7 portando los factores de virulencia *eae*, *rfb*_{O157} y Stx2 [137]. Situación que obedecería a la adopción de las BPM y del sistema de control HACCP.

La presencia de E. coli O157:H7 ha sido un hallazgo frecuente en establecimientos de venta al público de productos cárnicos frescos y secos [104,137].

En la Argentina, se detectó un 8,4% de STEC O157:H7 en hamburguesas congeladas comerciales y un 3,9% en productos cárnicos a nivel de boca de expendio (Chinen et al, 2001). Estas tasas de prevalencia y los aislamientos de serotipos STEC de carne bovina, enfatizaron el rol de la carne en las infecciones humanas [104].

En un relevamiento realizado sobre la presencia de E. coli O157:H7 en negocios de venta minorista de productos cárnicos, en la localidad de Gualguaychú, provincia de Entre Ríos, Argentina, se detectó en el 3,8% (6/160) de las muestras de carne picada, en el 4,8% (4/83) de los chorizos frescos y en el 3,3% (1/33) de chorizos secos. La

caracterización genotípica de las cepas aisladas reveló la presencia del gen *eae*. En las 6 cepas de carne picada, se encontró que 4 portaban los genes para Stx12 y las dos restantes, una Stx1 y la otra Stx2. De las 4 cepas aisladas en chorizos frescos, en 3 portaban Stx2 y en la restante Stx12, mientras que en la única cepa aislada en chorizos secos se identificó Stx2 [49].

En la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina, se realizó un seguimiento para detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas, en las bocas de expendio de una cadena de supermercados local. De las 37 muestras de carne picada y 43 de hamburguesas congeladas, solamente se aisló STEC en una de las muestras de carne picada, portando el gen *eae* y Stx2 [157].

El aislamiento de *E. coli* O157:H7 en 9/113 muestras de carne picada y en 3/23 de embutidos, obtenidas en carnicerías de la provincia de Tucumán, Argentina, se encontró la presencia de los factores de virulencia *eae*, *rfb*_{O157}, Stx2 [137].

Otras referencias indican que a nivel de los comercios de procesamiento y venta minorista de carne, las mesadas y los elementos de procesamiento de alimentos, como cuchillos, máquinas de picar y sierras, representan los lugares en los cuales se detecta frecuentemente STEC O157 [72,76,80,81,83,85,87].

2.14.- Efectos y consecuencias de la STEC sobre el comercio de alimentos

La existencia de animales excretores de EHEC O157:H7 no solo adquieren relevancia epidemiológica, por el hecho mantener a la *E. coli* en el ambiente y favorecer su diseminación; si no que a su vez, su existencia gravita en el mercado internacional, poniendo en riesgo la comercialización de las carnes Argentinas.

Actualmente la OMS considera que los alimentos son la mayor fuente de exposición a riesgos, por la presencia de agentes patógenos, tanto químicos como biológicos, que afectan sin distinción, el nivel de desarrollo de los países [103].

Los estudios de la OMS indican que, entre el 5 y el 10 por ciento de la población de los países desarrollados, se ve afectada anualmente por la incidencia de enfermedades infecciosas como la salmonelosis, la campilobacteriosis y las infecciones causadas

por *Escherichia coli* O157:H7, asociadas a la contaminación de los alimentos (OMS, 1997).

Como consecuencia de esta realidad, la Administración de Medicamentos de Estados Unidos (USDA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA) [37], han establecido sistemas de control que comprenden leyes y normas rigurosas; que reglamentan mecanismos de inspección, análisis y certificación, para productos provenientes de países, cuyos sistemas de control de calidad e inocuidad no ofrecen el mismo nivel de protección que el que se aplica a los productos producidos en los Estados Unidos [37,102,103].

A su vez, la European Food Safety Authority (EFSA) de la Unión Europea, ha adoptado sus propias disposiciones de inspección y contralor, logrando así, uno de los más altos estándares de seguridad alimentaria en el mundo [37], garantizando la seguridad alimenticia de los consumidores, con herramientas como el Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), que permite el seguimiento fronterizo de información, para reaccionar rápidamente, cuando se detectan riesgos para la salud pública [105].

En este sentido, si bien el serotipo O157:H7 de EHEC, sigue siendo prevalente en muchos países, estos organismos (USDA – EFSA), han ampliado la lista de serogrupos como el O:26, O:111, O:121, O:45, O:103, O:145, a los que denominaron como los seis grandes (the big six) [14,42,43,104,110]

En consecuencia, otros Estados también han tomado medidas similares, por lo que muchos productos son y serán sometidos a controles estrictos por parte de las autoridades sanitarias, al ingresar a estos países, por lo que aumentarán los rechazos de mercaderías [84], ocasionando perjuicios a los países exportadores.

Estos rechazos no solo afectan a un producto o a un conjunto de productos, sino que involucran a otros tipos de mercancías, provenientes de los estados en los que se identifiquen malas prácticas higiénicas o de manejo y conservación.

No obstante, en los países importadores existe la certeza en que la solución no reside en el cierre de las fronteras, ni en la multiplicación de los sistemas de vigilancia, con el objeto de hacer que el ingreso de las mercancías sea más selectivo, sino en que los países exportadores, adopten estrategias de buenas prácticas a lo largo de toda la cadena productiva, en este caso, la cadena de la carne, desde la producción de terneros, pasando por la recría, el engorde y la terminación, hasta la planta frigorífica [65,66,103].

En consecuencia, la existencia de animales excretores de EHEC O157:H7 no solo adquieren relevancia epidemiológica, por el hecho mantener a la E. coli en el ambiente y por ende, favoreciendo su diseminación [45]; si no que a su vez, su existencia gravita en el mercado internacional, poniendo en riesgo la comercialización de las carnes Argentinas.

Por lo hasta ahora reseñado, el conocimiento de la dinámica de la excreción de la E. coli O157:H7 durante el ciclo de recría, engorde y terminación de terneros a corral e incluso aquellos engordados a pasto, permitirá generar aportes para el mejor entendimiento de la mecánica de la contaminación de las medias reses, contribuyendo así, a proyectar estrategias de control, que permitan disminuir la contaminación de la carne y sus subproductos por microorganismos productores de ETA , en especial las STEC [39,42].

Toda contribución que aporte información, para generar medidas que ayuden significativamente a los procesos de producción, gravitará positivamente en la consolidación del mercado internacional de carnes y por ende promoverá el desarrollo sustentable del sector pecuario argentino, con el consiguiente desarrollo social de las regiones involucradas en el sistema [14,17,44,45].

Capítulo 3: Justificación, hipótesis y objetivos

3.1.- Justificación y pertinencia temática

La aparición de enfermedades infecciosas emergentes, específicamente aquellas que se transmiten a través de los alimentos [52], implica tomar conciencia sobre los riesgos potenciales que generan para la salud humana.

En vista de esto, el presente trabajo se focaliza en el estudio del rol ejercido por los animales excretores de *E. coli* O157:H7. Entendiendo su rol como vectores de contaminación de la carne, mediante mecanismos que son abordados con la pertinencia adecuada. El objetivo es generar información científicamente válida y aplicable en pro de la prevención y en definitiva, de inocuidad de la carne manufacturada.

Como referencia de gestión, pueden citarse a las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), actualmente reunidas en el estándar ISO 22.000 - “Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos - Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria” [75].

Hasta hace solo 2 años, las medidas de prevención dirigían el esfuerzo al control en los frigoríficos, como única medida de lucha contra la *E. coli* O157:H7.

Actualmente la estrategia ha cambiado, adoptándose una visión sistémica, que aborda la lucha contra la diseminación de la bacteria, a través de mecanismos que permitan prevenir la contaminación ambiental, napas y cursos de agua, que a su vez contaminan hortalizas de hoja. [59,75].

El nuevo concepto mundial habla de una sola salud (one health): *Salud Humana – Salud Animal – Ambiente*. (FAO – OIE – WHO) [59]. En este sentido, la enfermedad producida por STEC es considerada, por la Organización Mundial de Sanidad Animal (originalmente Oficina Internacional de Epizootias -OIE-) como una zoonosis bacteriana de origen alimentario [76].

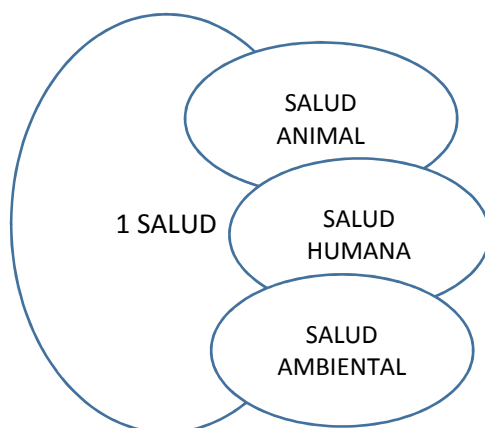


Figura 3: Interacción e Interrelación entre Salud Humana – Salud Animal – Salud Ambiental según FAO – OIE - WHO

En este sentido, las incumbencias de la carrera y los conocimientos aprendidos en sus materias, como gestión de la inocuidad en sistemas biológicos y alimentos, control estadístico de la calidad, herramientas para la calidad, metodología de la investigación, son instrumentos aplicables, que servirán de insumo para el desarrollo del trabajo de esta tesis.

Es así que, ampliando los conocimientos de la dinámica del comportamiento de la E. coli O157:H7, se contribuirá a fundamentar el concepto de una sola salud, donde la salud animal, salud humana y el ambiente interactúan y se interrelacionan [59].

3.2.- Hipótesis

- 1.- La detección de la presencia de animales positivos y su eliminación en etapas tempranas de la recría, permitiría reducir la incidencia de STEC en animales destinados a faena.
- 2.- La prevalencia de STEC en un ciclo de engorde se sostiene con la presencia de animales que excretan persistentemente a lo largo de todo el periodo.
- 3.- Factores estresantes, clima, cambios nutricionales, manejo, pueden influir en la excreción de STEC.
- 4.- La presencia de los factores de virulencia, Stx1, Stx2, presentes en las STEC excretadas por los animales, tienen comportamientos diferentes a lo largo del ciclo de engorde.

3.3.- Objetivos

3.3.1.- Objetivo general: finalidad

El objetivo del presente trabajo es determinar el rol de los bovinos, en la transmisión y persistencia de la E. coli O157:H7 en los corrales de confinamiento y a campo, durante la etapa de recría, engorde y terminación.

3.3.2.- Objetivos específicos

- 1.- Identificar la presencia de animales excretores de E. coli O157:H7 y sus factores de virulencia, desde el destete hasta la faena, de bovinos a corral y a campo, en un establecimiento ganadero de la provincia de La Pampa.
- 2.- Describir la dinámica de la excreción individual de la STEC desde el destete hasta el envío a faena.
- 3.- Generar aportes para el mejor entendimiento de la mecánica de la contaminación con E. coli O157:H7, para contribuir a proyectar estrategias de control que permitan disminuir su presencia en la carne y sus subproductos.

Capítulo 4.- Protocolo experimental – Instalaciones, animales y muestreo

En este capítulo se describe el método experimental y el universo muestral aplicados al ensayo propuesto, para el seguimiento del comportamiento de excreción de E. coli O157:H7 a lo largo del tiempo, en animales destinados para engorde con destino a faena.

4.1.- Introducción

Se utilizaron 120 terneros machos, recién destetados, pertenecientes a la EEA INTA Anguil.

Se encerraron los animales en 36 corrales de engorde, albergando entre 3 a 4 terneros por redil, distribuidos por peso. Los animales fueron alimentados utilizando una dieta de alta energía, con 3 niveles de proteína bruta (PB), 9% - 13% - 18%, durante 84 días.

Durante la etapa de recría, los animales pastorearon lotes de maíz (*Zea mays*) y de centeno (*Secale cereale*), consociado con triticale (cereal híbrido que procede del cruzamiento entre trigo, *Triticum spp* y centeno) durante 130 días de pastoreo directo a campo.

Transcurrido ese tiempo, los animales retornan nuevamente a las instalaciones de los corrales, donde permanecen todos juntos, durante 32 días, recibiendo una dieta de acostumbamiento, consistente en heno y avena (*Avena sativa*) en grano.

Concluido el periodo de acostumbamiento, comienza la etapa de terminación, en la cual se encierran a los novillitos en los corrales, guardando la distribución previamente fijada al inicio del ensayo. Se los divide en 2 grupos, con dos niveles de suplementación proteica, 9,5 y 13%.

A partir del 19 de marzo de 2014, mensualmente, durante el periodo de recría, el pastoreo a campo, hasta la finalización de la terminación de los novillos, el 24 de abril de 2015, se tomaron las muestras, mediante el HMRA, a todos los animales.

A partir del 12 de enero de 2015, se interrumpió la toma de muestras, por falta de presupuesto para la compra de los insumos, realizándose el último HMRA el 24 de abril, previo a la venta de los animales con destino a frigorífico.

Por último, en la planta frigorífica, al finalizar la faena, en la cámara de oreo, se realizaron los esponjados de las carcasas, con el propósito de determinar la presencia de E. coli O157:H7 en las mismas.

Manejo de los animales			
Recría Temprana	Recría Tardía	Acostumbramiento	Terminación
corrales	campo		corrales
19 marzo – 10 junio (84 días)	11 junio – 24 octubre (135 días)	25 octubre – 26 noviembre (32 días)	27 noviembre – 7 abril (131 días)
Grano 9-13-18% PB	Pastoreo 9% PB	Heno+avena 9% PB	Heno+grano 9,5-13% PB
21 marzo vacuna anti aftosa	21 octubre vacuna anti aftosa		4 marzo vacuna anti aftosa
24 marzo castración			
25 marzo mueren 2 animales			6 enero se retira 1 animal
19 marzo HMRA 21 abril HMRA 13 mayo HMRA 10 junio HMRA	7 julio HMRA 11 agosto HMRA 10 setiembre HMRA 11 octubre HMR	11 noviembre HMRA	9 diciembre HMRA 12 enero HMRA 7 abril HMRA
			24 abril faena

Tabla 1: Resumen del manejo de los animales durante el periodo de ensayo, desde el ingreso a los corrales hasta la faena

A continuación se propone un diagrama de flujo, para permitir visualizar y resumir el protocolo experimental propuesto para esta tesis.

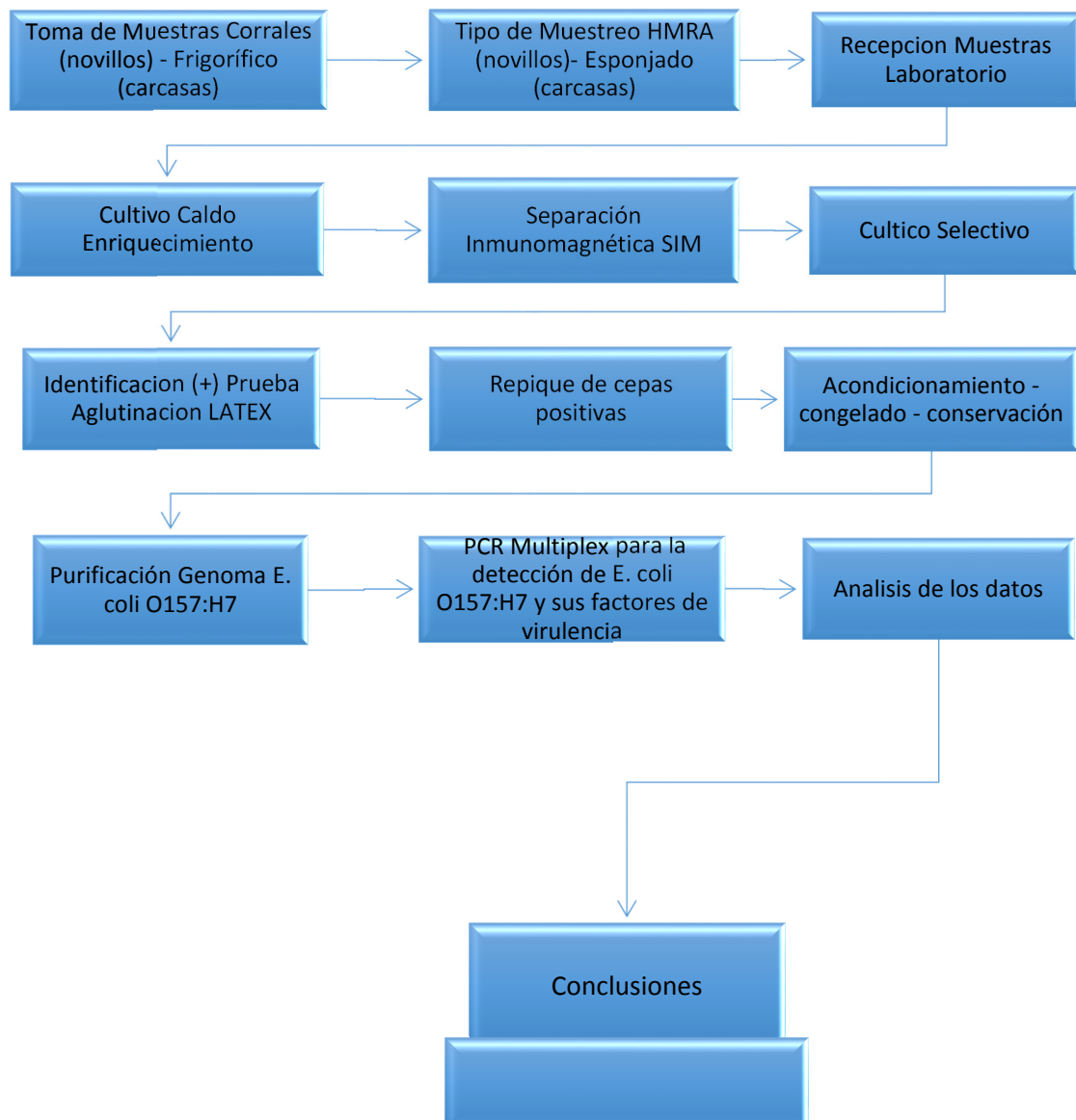


Diagrama 1: Diagrama de flujo para la identificación de muestras positivas.

4.2.- Animales e instalaciones

Para el diseño del ensayo se destinan 120 terneros machos, enteros (sin castrar), de raza británica, provenientes del rodeo de la EEA INTA Anguil, destetados los primeros días del mes de marzo de 2014. La edad promedio de los animales está comprendida entre 4 y 6 meses y un peso promedio de 169 kg, con un valor mínimo de 87 kg y 224 kg como valor máximo.



Foto 1: Distribución de los corrales. Cortina de árboles, calle y comederos sobre el sur. Pasillo para movimiento y manejo de los animales al norte. Puede apreciarse el declive del terreno, que permite el drenaje de los corrales hacia el norte.

Se dispuso la ubicación de los corrales sobre un terrero con una pendiente del 15%, orientada de sur a norte, permitiendo el escurrimiento de los corrales hacia el pasillo que se utiliza para el movimiento de los animales.

La disposición de los bebederos es compartida cada dos corrales, comenzando con el corral N° 1 y N° 2 y así correlativamente con el N° 3 y N° 4 hasta finalizar con el N° 35 y N° 36.



Foto 2: Caravana numerada de identificación individual, colocada en la oreja izquierda

Los comederos son individuales para cada corral y están ubicados sobre la calle que da al sur.

Los animales de cada corral tienen contacto con los de los corrales vecinos, a través del cerco alambrado de los mismos, comenzando por el corral N° 1, que contacta con el N° 2. El N° 2 contacta con el N°1 y el N° 3 y así sucesivamente.

Para disminuir factores estresantes de manejo, como destete y componentes ambientales, previo a la distribución de los terneros en los corrales, los animales permanecieron todos juntos, en el pasillo, utilizado para el movimiento de los mismos, consumiendo una dieta de acostumbramiento, consistente en heno de alta calidad y grano, por un lapso de 72 horas. Finalizado ese periodo, el 19 de marzo de 2014, se procedió a su encierre.

4.3.- Etapas del ensayo

Al ensayo de lo dividió en cuatro etapas:

Recría a corral con una duración de 84 días, desde el 19 de marzo al 10 de junio, con el objetivo de lograr los 250 kg promedio de peso vivo (PV).

Pastoreo a campo, con una duración de 135 días, desde el 11 de junio al 24 de octubre, con el objetivo de alcanzar 350 kg de PV.

Dieta de acostumbramiento en los corrales: Duración 32 días, desde 25 de octubre al 26 de noviembre.

Terminación en confinamiento, con una duración de 131 días, desde el 27 de noviembre al 7 de abril, con el objetivo de lograr un PV final de 380 kg de promedio.

4.3.1.- Recría a corral

Para la recría temprana a corral se dispusieron tres dietas de alta energía, basada en harina de soja, grano de maíz y heno de mijo, con un complemento vitamínico y mineral y un ionosforo modulador de la fermentación ruminal, con niveles diferentes de proteína del 9, 13, 18% respectivamente.

De tal manera que dentro de cada grupo quedaron, 6 corrales con nivel bajo de proteína, 6 corrales con nivel medio y 6 corrales con nivel alto.

Los animales se sometieron a un consumo restringido del 2,5 % de su PV en base seca, para evitar ganancias superiores a 1kg/día; impidiendo así el sobre engrasamiento.

A partir del 19 de marzo de 2014 se hacen pesadas mensuales, previo a un desbaste de 17 horas, ocasión que se hace coincidir con el hisopado de la mucosa recto anal (HMRA), para tomar las muestras individuales que permitan determinar la presencia de animales excretadores de E. coli O157:H7.

El día 21 de marzo, los terneros del ensayo fueron vacunados contra fiebre aftosa.

El día 24 de marzo, todos los animales fueron castrados por método quirúrgico, lo que provocó, como consecuencia de este acto, la muerte de dos terneros identificados con el número 750 y 795.



Foto 3: La disposición del bebedero, compartido cada dos corrales

4.3.2.- Pastoreo a campo

A partir del 10 de junio de 2014, después de permanecer durante 84 días en los corrales, los terneros son sacados del encierre y conducidos, todos juntos, a pastorear lotes de maíz en grano diferido, rotando en parcelas construidas *ad hoc*, conforme disponibilidad visual de forraje.

A partir del 9 de setiembre pasan a pastorear lotes encañados de centeno y triticale, hasta su reingreso a los corrales, lo que acontece el día 24 de octubre; sumando 135 días de pastoreo a campo.

El día 21 de octubre, todos los terneros del ensayo fueron vacunados nuevamente contra fiebre aftosa.

4.3.3.- Dieta de acostumbramiento en los corrales

En los corrales reciben una dieta de acostumbramiento, consistente en heno (rollo) en pie a discreción y grano de avena desde el 25 de octubre hasta el 26 de noviembre.

4.3.4.- Terminación en confinamiento

A partir del 26 de noviembre se le agrega maíz al consumo de avena, para formular dos dietas de terminación, con 9,5% y 13% de PB, con un consumo restringido del 2,6 % del PV, distribuyendo nuevamente a los animales en los corrales, guardando la distribución previamente fijada al inicio del ensayo. El 12 de enero de 2015 se realiza el último HMRA de los novillos, en la etapa final de engorde, con peso promedio de 380 kg, posponiéndose, por razones presupuestarias, la realización del HMRA final, previo a la venta de los animales, lo que aconteció el 7 de abril de 2015.



Foto 4: Caravana colocada en el pabellón derecho, para identificar el nivel de PB de la dieta a los que fueron sometidos los animales

El día 4 de marzo, la totalidad de los novillos del ensayo son vacunados nuevamente contra fiebre aftosa. Los animales son cargados el 23 de abril por la madrugada y transportados a la planta frigorífica, para ser faenados al día siguiente.

RECRÍA (corrales)	
19 mar-10 jun	9 % PB
19 mar-10 jun	13 % PB
19 mar-10 jun	18 % PB
PASTOREO CAMPO	
25 oct-24 oct	Maíz – centeno – triticale = 9% PB
ACOSTUMBRAMIENTO	
25 oct-26 nov	Heno + avena = 9% PB
TERMINACIÓN (corrales)	
27 nov- 15 abr	Heno + avena + maíz = 9,5 % PB
27 nov- 15 abr	Heno + avena + maíz = 13 % PB

Tabla 2: Factores de alimentación de acuerdo a las dietas de recría, pastoreo a campo y terminación

Capítulo 5.- Materiales y Métodos

5.-1.- Introducción

En este capítulo se describen, en primer término, la preparación de los insumos y materiales, utilizados para la realización del HMRA en los animales y los materiales y métodos para llevar adelante las pruebas de aislamiento e identificación de la E. coli O157:H7 y sus factores de toxicidad.

5.2.- Materiales

5.2.1.- Preparación del caldo de enriquecimiento tripticasa soja (TSB)

Los caldos de enriquecimiento son utilizados para recuperar microorganismos patógenos, a partir de muestras donde hay una elevada concentración de microorganismos comensales. Estos son inhibidos en el caldo de enriquecimiento selectivo, permitiendo que células bacterianas de STEC O157 entren en fase logarítmica de crecimiento, pudiendo competir mejor por su supervivencia [113,116], para su posterior procesamiento en el laboratorio.

El caldo se prepara en un Erlenmeyer de 2 litros, al que se le agregan 30 g de TSB (Oxoid Cod: CM0129B), previo pesado en balanza de precisión y se debe completar a 1 litro con agua destilada ultra pura, calentado luego en un mechero bunsen hasta hervor.

Luego se lleva a autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera. Una vez frío, en la cabina de bioseguridad, previa reconstitución de cada frasco ampolla, se agregan al medio, 2 viales de 3,00 mg de vancomicina (Oxoid Cod. SRO186E) y 2 viales de 1,25 mg de telurito de potasio y 0,025 mg de cefixima (Oxoid SRO172E), con el propósito de reducir el nivel de la flora comensal. Por último, se fracciona a razón de 5 ml en viales y se conserva refrigerado hasta el momento del HMRA.

5.2.2.- Preparación de la Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) + Polioxietileno monolaurato de sorbitán 20 (Tween 20)

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos o Phosphate Buffered Saline (PBS) por sus siglas en inglés, constituye una solución tampón o buffer, amortiguadora de pH, empleada para procedimientos bioquímicos, ya que por su concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos y su pH es de 7.4.

La concentración de iones es isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual a la intracelular, por lo que no es tóxica para las células y se la emplea en el cultivo y el lavado de las mismas.

Es una solución acuosa salina, que contiene Cl Na , Cl K , con el agregado de reguladores de pH, sodio fosfato dibásico anhidro (Na_2HPO_4) y potasio monobásico anhidro (PO_4KH_2), con el agregado de cantidad suficiente de agua destilada pura.

El polioxietileno monolaurato de sorbitán 20 (Tween 20) se agrega como un tensioactivo no iónico, para emulsionar y estabilizar la solución [115].

El PBS tween se prepara en un Erlenmeyer conteniendo 1 litro de agua bidestilada, a la que se le agregan 2 g de PO_4KH_2 ; 11.5 g de Na_2HPO_4 ; 2 g de ClK y 80 g de ClNa [114].

Luego, cada 200 ml de PBS se le deben agregar 100 μl de tween 20, con pipeta calibrada. La solución una vez preparada, se acondiciona y se lleva a autoclave por 20 minutos a 1 atmósfera. Una vez fría la solución, se debe guardar refrigerada, hasta su posterior utilización.

5.2.3.- Preparación de Agar Mac Conkey Sorbitol + suplemento de Cefixima Telurito de Potasio (SMAC_{CT})+ Suplemento MUG

Todas las cepas EHEC aisladas de pacientes con SUH son incapaces de fermentar el sorbitol (Mach y Ratnam, 1986) por lo que, para realizar el primer aislamiento, se utiliza Agar Sorbitol – McConkey, ya que permite seleccionar rápidamente las colonias no fermentadoras de este azúcar, que aparecen de color blanco pajizo), permitiendo descartar al resto.

El medio Agar Sorbitol – McConkey se complementa con el agregado del suplemento de Cefixima Telurito de Potasio (SMAC_{CT}) y el suplemento MUG (4-metilumbeliferil-beta-D-glucuronido).

Para prepararlo, se vierten en un Erlenmeyer, 2 litros de agua estéril y pura, a la que se agregan 103 g de agar Mac Conkey (Oxoid Cod: CM0115B). Luego se calienta en mechero bunsen y se revuelve hasta la disolución del agar, lo que acontece, cuando se aclara el color, pasando de rojo intenso a rosado pálido.

Concluido este paso, se reconstituyen 2 viales de 50 mg de suplemento MUG (Oxoid Cod: BRO071E) y se agregan al agar, antes de llevar a esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera.

El suplemento MUG reacciona frente al crecimiento de colonias no pertenecientes a las cepas de E. coli O157, que lo metabolizan, provocando luminiscencia fluorescente, color celeste turquesa, cuando las placas de Petri son sometidas a un haz de LUV.

Transcurrido el proceso de esterilización, se lleva el agar a la sala de plaqueo y se deja enfriar a 50°C.

Luego, se agregan 2 viales de 1,25 mg de telurito de potasio y 0,025 mg de cefixima (Oxoid SRO172E), con el propósito de reducir selectivamente el nivel de la microbiota de competencia, en particular Proteus spp., que representan un gran número de bacterias que no fermentan al sorbitol.

Posteriormente se procede al llenado de las placas de Petri, agregando 20 ml de SMAC_{CT}, mediante el uso de una bomba dosificadora peristáltica.

Una vez frías, se conservan en heladera a 4°C, hasta su utilización.

El suplemento MUG reacciona frene al crecimiento de colonias no pertenecientes a las cepas de E. coli O157, que lo metabolizan, provocando luminiscencia fluorescente de color celeste turquesa, cuando las placas de Petri son sometidas a un haz de LUV. De esta manera se agiliza la identificación de las colonias de E. coli O157.

5.2.4.- Preparación de Agar Mac Conkey

Este medio se prepara mezclando 50g del polvo de Agar Mac Conkey (Britania Código B0211406) en un litro de agua destilada pura, contenido en un Erlenmeyer con 2 l de capacidad.

El siguiente paso consiste en calentar la mezcla hasta el hervor, para disolver el polvo.

Posteriormente se lleva a autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera, para esterilizar.

Por último se procede a plaquear el Agar Mac Conkey mediante el uso de una bomba dosificadora peristáltica, llenando cada placa con 20 ml de agar.

Una vez frías, se conservan en heladera a 4°C, hasta su utilización.

5.2.5.- Preparación del caldo de enriquecimiento modificado (TSBm + 8 mg novobiocina)

El caldo de enriquecimiento tripticasa soja, modificado con 8 mg de novobiocina, se lo utiliza para recuperar microorganismos patógenos, que se encuentran en muy bajo número, a partir de muestras de alimento, donde hay una elevada concentración de microorganismos comensales Gram positivos.

Estos son inhibidos en el caldo de enriquecimiento selectivo, permitiendo que células bacterianas de STEC O157 entren en fase logarítmica de crecimiento, pudiendo competir mejor por su supervivencia [116].

El caldo se prepara midiendo en una probeta calibrada, 1 litro de agua destilada ultra pura y se vierte en un Erlenmeyer de 2 litros, a la que se le agregan 30 g de TSB (Oxoid Cod: CM0129B) previo pesado en balanza de precisión y calentado en un mechero bunsen hasta hervor, para disolver.

Luego se lleva a autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera. Una vez frío, en la cabina de bioseguridad, previa reconstitución de cada frasco ampolla, se agregan al medio 8,00 mg de novobiocina (Oxoid Code: SR0181 - Novobiocin selective supplement) y 2 viales

de 1,25 mg de telurito de potasio y 0,025 mg de cefixima (Oxoid SRO172E), con el propósito de reducir el nivel de la microbiota de competencia [117].

El caldo debe conservarse refrigerado hasta el momento de su utilización.

5.2.6.- Preparación del caldo de enriquecimiento de agua peptonada (CEAP)

Este es un medio de enriquecimiento no selectivo usado como diluyente, para el enriquecimiento bacteriano, a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Es recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica, para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento [118], en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico [119].

El caldo se prepara midiendo en una probeta calibrada, 1 litro de agua destilada ultra pura y se vierte en un Erlenmeyer de 2 litros, a la que se le agregan 10 g de Peptona carne (Britania, Código B0215205) y 5 g de cloruro de sodio (Britania, Código B0215206), previo pesado en balanza de precisión.

El paso siguiente consiste en mezclar el preparado, calentado en un mechero bunsen hasta ebullición, durante 1 minuto, para disolver.

Luego se esteriliza en autoclave a 121°C a 1 atmosfera, durante 15 minutos.

Una vez frio, se debe almacenar con un pH final de 7,2 +/- 0,2, refrigerado.

5.2.7.- Esponjas de poliuretano

Para la toma de las muestras de las medias reses, en la cámara de oreo de la planta frigorífica, se acondicionan esponjas de poliuretano de alta absorción, de 4 por 4 cm por 2 cm, las que se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En cámara de bioseguridad se acondicionan las esponjas, embebiéndolas con 10 ml de caldo de enriquecimiento de agua peptonada, para hidratarlas y se las coloca en bolsas

de Stomacher, bolsas de polietileno estériles por radiación, (Deltalab **Código:** PLA-00030), dispuestas para el esponjado de las carcasas.

Las mismas se mantienen refrigeradas, hasta el momento de la toma de las muestras.

5.3.- Métodos

En el bovino, la EHEC O157 tiene la capacidad de colonizar la región terminal del tracto gastrointestinal, en los últimos centímetros del recto, [17]. Esta ubicación permite, mediante la utilización de un hisopo estéril, recolectar muestras de materia fecal, para su posterior aislamiento.

5.3.1.- Toma de muestras de la Mucosa Recto – Anal (MRA):

Las muestras se tomaron inmovilizando a los terneros en la manga. Se procedió a realizar hisopados individuales de la mucosa recto anal (MRA), introduciendo un hisopo, aproximadamente 2 a 5 cm dentro del ano, realizando un movimiento circular, abarcando el perímetro de la juntura recto-anal (RA).



Foto 5: Hisopado de la mucosa recto anal

Luego, cada hisopo se colocó en viales conteniendo 5 ml de medio de cultivo de caldo tripticosa soja (TSB), suplementado con vancomicina, cefixima y telurito de potasio.

Una vez terminado el HMRA, las muestras son llevadas al laboratorio, donde son incubadas en estufa a 37°C durante 18 horas.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a la separación inmunomagnética (SIM) de las cepas de E. coli contenidas en el caldo.

5.3.1.1.- Separación inmunomagnética de E coli O157 (SIM)

5.3.1.1.2.- Fundamento

Las perlas anti – E. coli (Dynabeads® MAX E. anti – E. coli O157; Catalog N° A10714 and A10715 - Version A DYNAL MPC®-M, Noruega) están diseñadas para realizar una

separación selectiva de *E. coli* O157, directamente de muestras enriquecidas en el medio TSB, usando la separación inmunomagnética.

Las perlas anti *E. coli* O157 son pequeñas esferas microscópicas de poliestireno, mezcladas con óxido de hierro paramagnético, recubiertas con anticuerpos purificados anti *E. coli* O157.

Las perlas se preparan incubándolas en una muestra pre enriquecida, para que los anticuerpos específicos contra *E. coli* O157 se adosen a la superficie de las perlas, de manera tal, que permitan la unión antígeno – anticuerpo, agrupando a las cepas de *E. coli* O157 del cultivo.

Este complejo perla – bacteria se separa luego del resto de la mezcla, aplicando al cultivo un campo magnético.

De esta manera, las *E. coli* O157 patógenas y no patógenas quedan adheridas a las micro perlas, separando así, rápidamente a las bacterias del medio inicial.

Este procedimiento es utilizado para hacer una primera separación selectiva de las *E. coli* O157 de las muestras obtenidas por el HMRA, contenidas en el medio de cultivo TSB.

5.3.1.1.3.- Procedimiento

El primer paso consiste en resuspender las perlas anti *E. coli* en vortex (agitador mecánico), poniendo posteriormente, con pipeta calibrada, 20µl de la suspensión de perlas anti – *E. coli* en tubos tipo Eppendorf.

Luego, a cada tubo Eppendorf se le vierte 1 ml de caldo de enriquecimiento TSB, cultivado durante 18 horas a 37° C, conteniendo los hisopos del HMRA.

Se cierran los tubos y se llevan a un agitador suave, a temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Cumplido el tiempo de agitación, se insertan los tubos en una placa concentradora de partículas (PCP) (DynaL MPC®-S Biotec - Magnetic Particle Concentrator for

Microcentrifuge Tubes – Pro. N° 120.20), a la que se le agrega en la parte posterior, la placa magnética, durante 5 minutos, para que las micro perlas que contienen el complejo antígeno – anticuerpo de E. coli, quedan adheridas a la pared del tubo Eppendorf.

Transcurridos los primeros cinco minutos del proceso, se vuelca cuidadosamente el contenido de los tubos Eppendorf y se le agrega a cada tubo, 1 ml de solución tampón de lavado PBS – Tween 20.

Se quita la placa magnética y se invierte la PCP 5 veces y se repite nuevamente el procedimiento.

Esta operatoria se reitera 3 veces, con el objeto de eliminar otras bacterias contaminantes, hasta que al final de la tercer operatoria, se vuelca el sobrenadante y se re suspende el pellet adherido a la pared de cada tubo en 100 µl de tampón de lavado PBS – Tween 20.

5.3.1.2.- Cultivo selectivo de Escherichia coli 0157

Después del último paso de la SIM, se toman 50 µl de la suspensión, con una pipeta calibrada y se la esparce en un cuadrante de una placa de Petri, conteniendo Agar Mac Conkey Sorbitol + cefixima telurito + suplemento MUG (SMAC_{CT}).

Para desarmar los complejos de las inmunoperlas – E. coli, se siembra inmediatamente con un ansa en el resto de los cuadrantes de la placa.

Una vez terminada la siembra de todas muestras, las placas se incuban a 35 – 37°C por 18 – 20 horas.

Las cepas EHEC incapaces de fermentar el sorbitol, generan colonias amarillo pajizo (Mach y Ratnam, 1986), por lo que, con la utilización de Agar Sorbitol – McConkey Sorbitol + cefixima telurito + suplemento MUG (SMAC_{CT}), se logra seleccionar rápidamente las colonias de E. coli O157:H7, que no fermentan de este azúcar.

En cambio las colonias no pertenecientes a cepas de E. coli O157:H7 metabolizan al sorbitol y al suplemento MUG contenido, generando el crecimiento de colonias color rojo intenso, con fuerte luminiscencia fluorescente color celeste turquesa alrededor de ellas.

Esto facilita la selección de las colonias E. coli O157:H7, para la posterior confirmación, a través de la prueba de aglutinación.

5.3.1.3.- Prueba de aglutinación de látex para la identificación de la E. coli O157:H7

Para confirmar el aislamiento de E. coli O157:H7 de las colonias amarillo pajizo, que durante su crecimiento, no fermentaron al sorbitol y no metabolizaron al MUG, se utiliza la prueba de aglutinación, que es un método basado en la reacción de los anticuerpos anti O157:H7 (Latex Test Kit (Oxoid,Cod: DR0620) con los antígenos presentes en las cepas aisladas.

Previo a la rutina de diagnóstico, se retiran los reactivos del Kit de la heladera y se los lleva a temperatura ambiente. Luego se agitan los frascos provistos por el Kit y se procede a chequear el correcto funcionamiento de los reactivos, mediante las pruebas de control, suministradas por el fabricante.

Con un ansa, se recoge una porción de la colonia a identificar, depositándola sobre el borde de uno de los círculos de las tarjetas de reacción, provistas por el Kit.

Cuidadosamente se dispensa una gota del reactivo y posteriormente, con movimientos circulares, se mezcla la muestra con un ansa, asegurándose de extenderla hasta cubrir la mayor parte del área de reacción.

Para finalizar, se somete a la tarjeta a movimientos circulares, observando si se produce la aglutinación, la que debe ocurrir en el término de un minuto. Si aglutina, se observa un granulado celeste oscuro en un medio líquido traslucido. Esto indica la presencia de E. coli O157.

Si no se da la aglutinación, debe interpretarse como resultado negativo e indica ausencia de E. coli O157:H7. En este caso, se procede a probar con otra colonia de la misma placa, antes de descartarla.

5.3.1.4- Congelación y conservación

Una vez identificadas las cepas de *E. coli* O157:H7, se las replica en medio Agar Mac Conkey (Britania Código B0211406) y se las lleva a estufa, para su cultivo, a 35° – 37°C por 18 – 20 horas.

Al finalizar el tiempo de incubación, se procede al acondicionamiento de las cepas en tubos crioviales (Cryoinstant - Delta Lab Cod. 409113/1), para su almacenamiento y conservación a -74°C, hasta la posterior extracción de ADN de la *E. coli* O157:H7, para la caracterización genética de las cepas, por prueba de PCR.

Para ello se procede a tomar con ansa, una muestra de la placa de Agar Mac Conkey, conteniendo el crecimiento de las colonias; introduciéndola en un tubo criovial, (Crioperlas Cryoinstant™, Instrumentación Científica Técnica, S.L.) que es un sistema estéril de conservación de cepas microbiológicas, consistente en un criovial de 2 ml, conteniendo 25 crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores que actúan como conservante.

Posteriormente, con el criovial cerrado, se agita con vortex, para homogeneizar la muestra.

Por último, con pipeta Pasteur, se elimina el medio de suspensión, se rotula el tubo y se lleva a heladera a -74°C.

5.3.2.- Esponjado de medias reses en cámara de oreo

En el frigorífico se realizó el seguimiento de la faena, acompañando el procesamiento de los novillos, desde el cajón de noqueo (insensibilización ante mortem) hasta la cámara de oreo, (sala refrigerada, destinada a la maduración de la carne), lugar donde se extraen las muestras, mediante esponjado de la superficie de las medias reses faenadas, para verificar la posible contaminación de las carcasas con *E. coli* O157:H7, durante la faena.

5.3.2.1.- Toma de muestras

En la cámara de oreo se procede a invertir las bolsas Stomacher, conteniendo las esponjas embebidas en CEAP, para frotar la superficie de la zona perianal, glúteo, cuello, flanco, pecho y zona de corte del raquis de las carcasas [102].

Una vez terminado el procedimiento, se reintroduce la esponja en la bolsa y se procede a su cerrado.

En el laboratorio, a cada bolsa conteniendo las esponjas, se le agregan 100 ml de caldo de enriquecimiento modificado (TSBm + 8 mg novobiocina/l) y se las vuelve a cerrar. Concluido este procedimiento, las bolsas se cultivan en estufa a 42° C durante 18 a 20 horas.

Concluido el tiempo de incubación, se procesa a cada una de las muestras, como a las del HMRA.

5.3.3.- Prueba de validación de las cepas aisladas

Para control, se repican nuevamente, todas las cepas congeladas hasta ese momento, en Agar Mac Conkey Sorbitol + suplemento de cefixima telurito de potasio (SMAC_{CT})+ suplemento MUG (Oxoid Cod: CM0115B).

Las cepas que no metabolizaron el sorbitol y el MUG y generaron colonias amarillo pajizo, después de 18 horas de cultivo a 37°C, se vuelven a someter a la prueba de aglutinación en placa para E. coli O157 (Latex Test Kit Oxoid, Cod: DR0620).

Las cepas que aglutinan, confirmando la presencia de E. coli O157:H7, se repican en Agar Mac Conkey (Britania Código B0211406) y se cultivan durante 18 a 20 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación de las cepas de E. coli O157:H7, se acondicionan en tubos crioviales, para su almacenamiento y conservación, a -74°C, hasta la extracción de ADN de la E. coli O157:H7 y caracterización genética de cepas por prueba de PCR.

5.3.4.- Extracción de ADN

Una vez finalizado el ensayo se toman todas las cepas aisladas (mantenidas a -74°C) y se las cultiva en Agar Mac Conkey (Britania Código B0211406) a 35° – 37°C por 18 – 20 horas. Luego se toma con ansa de cada cultivo una muestra y se procede a su dilución en PBS para luego realizar la extracción de ADN. El material así obtenido es utilizado posteriormente para caracterizar las cepas patógenas a través de los perfiles antigénicos. [1,2,3,14,15]

5.3.4.1.- Método para la extracción de ADN

A continuación, en el diagrama 2, mediante un flujo lineal, se detalla la metodología para la extracción de ADN de las cepas de E. coli O157:H7, utilizando un kit comercial específico, (DNeasy® Blood & Tissue Handbook – Dneasy Blood & Tissue Kit), de las muestras previamente congeladas, al finalizar el proceso de aislamiento e identificación.

EXTRACCIÓN DE ADN

Extracción del ADN de las cepas de *E. coli* O157:H7 de las muestras previamente congeladas, utilizando un kit comercial específico, el (DNeasy® Blood & Tissue Handbook - DNeasy Blood & Tissue Kit).

PRIMER PASO

Re-suspender, en un tubo, la muestra de *E. coli* O157:H7 en 200 µl de PBS, con el agregado de 20 µl de proteinasa K, cuya función es facilitar la lisis y degradación de las proteínas bacterianas, para obtener una muestra mucho más pura.

SEGUNDO PASO

Finalizado el paso inicial, se agregan 200 µl de Buffer AL (provisto por el Kit) y se agita con vortex, para llevar luego a estufa a 56°C durante 10 minutos.

TERCER PASO

Transcurridos los 10 minutos, se agregan 200 µl de etanol (96-100%) y se lleva el tubo a vortex para agitación. Se pipetea el contenido del preparado obtenido en el paso anterior y se lo deposita en la columna (DNeasy Mini spin column) provisto por el kit y se la inserta la columna en un tubo de depósito de 2 ml.

CUARTO PASO

Acto seguido, se lleva a centrifuga a 8.000 rpm, durante 1 minuto y se descarta el filtrado y el tubo de recogida, conservando la columna (DNeasy Mini spin column), la que se introduce en un nuevo tubo de colección de 2 ml, al que se le agrega 500 µl del Buffer AW1.

QUINTO PASO

Luego, el tubo se centrifuga, durante un minuto a 8.000 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se vuelve a descartar el filtrado y el tubo de recolección.

SEXTO PASO

La columna (DNeasy Mini spin column) se introduce en un nuevo tubo de colección de 2 ml y se le agrega 500 µl del Buffer AW2. Se lleva a centrifuga durante 3 minutos a 14.000 rpm.

SEPTIMO PASO

Finalizado este paso, se descarta el filtrado y el tubo de recolección. La columna (DNeasy Mini spin column) se transfiere a un nuevo tubo de 2 ml para micro centrifugación.

OCTAVO PASO

Seguidamente se enjuaga la disolución de ADN, agregando 200 µl del Buffer AE, en el centro de la membrana de la columna (DNeasy Mini spin column).

NOVENO PASO

Una vez concluido este paso, se incuba a temperatura ambiente (15 – 20°C) durante 1 minuto y luego se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 rpm.

DECIMO PASO

Por último se descarta la columna (DNeasy Mini spin column) y el eluido logrado en el último paso, después de la centrifugación, se lleva a freezer a - 4°C.

Diagrama 3: Flujo lineal, detallando la metodología para la extracción de ADN de las cepas de *E. coli* O157:H7, utilizando el DNeasy® Blood & Tissue Handbook - DNeasy Blood & Tissue Kit.

5.4.- PCR reacción en cadena de la polimerasa

5.4.1.- PCR Multiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 *eae*, *Stx1*, *Stx2*, *rfbO157*

Se utilizó una reacción de PCR que permite detectar los genes de la región constante de Intimina (*eae*), de las *Stx1* y *Stx2* y del responsable de la síntesis del antígeno O (*rfbO₁₅₇*), utilizando un termociclador MyCycler®.

La amplificación selectiva de las secuencias específicas de ADN bacteriano es realizada en un volumen final de 50 µl (Tabla N° 1), la cual contiene:

Componente	Concentración	Volumen
Templado ADN	-	2,5µl
Buffer Taq	1X	2,5µl (de una solución10X)
MgCl ₂	2mM	1µl (de 50mM)
DNTPs	0,2mM (de cada uno)	0,5µl (de 10mM)
Primer EAE-1	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer EAE-2	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer vt1-a	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer vt1-b	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer vt2-a	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer vt2-b	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer O157R	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Primer O157F	30 pmol	0,75µl (de 20µM)
Taq	1,25U	0,125µl (de 5U/µl)
H ₂ O	-	11,375µl
		25µl

Tabla 2: Componentes para la amplificación selectiva de las secuencias específicas de ADN bacteriano dispuestas en un volumen final de 50 µl

Como control se utilizó el ADN templado de cepa *E. coli* O157:H7 EDL933, provista por Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

Las condiciones de amplificación para la PCR fueron a 94°C por 2 minutos, para producir la desnaturalización inicial; seguida de 60 segundos a 94°C; continuando con 60 segundos a 57°C; terminando con 60 segundos a 72°C por 30 ciclos. [32,33].

Posteriormente los productos amplificados fueron visualizados en un medio gel de agarosa al 2%, con el agregado de 5 µg/ml del colorante fluorescente intercalante bromuro de etidio; utilizando 10 µl de la mezcla.

El tiempo de electroforesis a las que fueron expuestas las muestras fue de 60 minutos a 130V.

Los fragmentos amplificados de tamaño específico son visualizados posteriormente utilizando luz ultravioleta (LUV).

Primer	Secuencia 5'-3'	Amplificación (pb)	Condiciones	Referencia
EAE-1	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	345	94 °C, 2 m (1 ciclo); 94 °C, 60 s; 57 °C, 60 s; 72 °C, 60 s (30 ciclos)	Blanco 2004
EAE-2	GGCGCTCATCATAGTCTTTC			Olsvik 1993
Vt1-a	CAGTTAATGTGGTGCGAAG	894		Olsvik 1993
Vt1-b	CTGCTAATAGTTCTGCGCATC			
Vt2-a	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478		Olsvik 1993
Vt2-b	GGATGCATCTCTGGTCATTG			
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	258		Paton 1998
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC			

Tabla 3: Primers a utilizar con la secuencia de nucleótidos de factores de virulencia de E. coli O157:H7 (Invitrogen, EEUU) para amplificación del ADN en la prueba PCR multiplex [160,161,162].

5.5.- Toma de datos

Para poder determinar los posibles factores climáticos que pueden predisponer la excreción de E. Coli O157:H7 en los animales del estudio, se accedió a los datos del registro diario de la Estación Meteorológica (E. M.) de la E.E.A INTA Anguil, de donde se extrae información sobre temperatura y precipitaciones, desde el inicio del ensayo hasta el momento de la faena.

Se tomaron los registros de las temperaturas, a las 01 hs – 06 hs - 08 hs – 10 hs, durante los 15 días previos a cada HMRA.

Se calculó el promedio y se buscó el rango de las temperaturas máximas y mínimas en cada periodo de tiempo.

Se obtuvieron los registros de las precipitaciones, 15 días previos al HMRA. Analizando los datos, se calcularon las lluvias acumuladas que incidían previamente a la fecha de los muestreos.

Para poder determinar los posibles factores nutricionales que pueden predisponer la excreción de E. Coli O157:H7, se registró la composición de las dietas de la recría y de terminación y la identificación de los animales que fueron sometidos a cada una de ellas. Concomitantemente, se registraron los eventos de manejo que tuvieron efectos estresantes sobre los animales, como cambios de dieta, fechas de castración y de vacunación.

5.6.- Análisis estadístico

La relación entre la excreción de STEC y la portación de los genes que codifican los factores de virulencia, Stx1, Stx2 y sus variantes con los factores ambientales, la temperatura máxima, mínima y media; las precipitaciones se modelaron con una regresión Poisson. Esta es una forma del modelo lineal generalizado, en el que se asume que la variable respuesta tiene una distribución Poisson y el logaritmo de su valor esperado puede ser modelado por una combinación lineal de variables con parámetros (coeficientes) desconocidos, que se estiman por métodos numéricos. Se usó el procedimiento GENMOD de SAS, versión 9.2 (Pedan, 2001) para ajustar modelos completos y reducidos con las distintas variables, eliminando aquellas que no aportaban significativamente al modelo [131,132].

La relación del peso de los animales, divididos en livianos y pesados, los distintos tipos de alimentación, recría, pastoreo a campo, terminación y la composición de la dieta, en los distintos momentos del ensayo, con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia, se analizó mediante tablas de contingencia y pruebas de Chi cuadrado [131,132].

Se calcularon los intervalos de confianza para las distintas condiciones de manejo y su relación con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia [131,132].

Capítulo 6: Resultados

6.1.- Introducción

En el presente capítulo se consignan los aislamientos de STEC en los animales muestreados y se exponen los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección e identificación de los genes de la región constante de intimina (*eae*), el gen *rfbO*₁₅₇, responsable de la síntesis del antígeno somático O y de los genes que codifican las citotoxinas Shiga (Stx1, Stx2 y Stx1-Stx2) portados por la STEC, durante los periodos de recría, pastoreo a campo y terminación.

Se relevaron y consignaron los registros climáticos (temperatura y precipitaciones) y los factores de manejo (castración, vacunaciones y alimentación).

Se clasificaron a los animales por etapa de engorde, peso y tipo de dieta recibida.

Se presentan los resultados, relacionando la cantidad de animales excretores de STEC vinculados con posibles factores predisponentes, como variables climáticas ligadas a las lluvias y la temperatura ambiente.

Se busca relacionar también el factor cronológico, analizando los patrones de excreción de STEC, de acuerdo a la edad y el peso, según el momento del año y/o la etapa de engorde.

Se analiza la asociación entre la composición de las distintas dietas a las que fueron sometidos los animales, durante el periodo de engorde, con la excreción STEC y la presencia de Stx.

Se relacionaron los factores climáticos como posibles factores predisponentes de la presencia de las Stx en las STEC excretadas por los animales.

Por otro lado, se indagó sobre los efectos del estrés emergente, como consecuencia del ingreso a los corrales, la castración y las vacunaciones y los cambios de dieta, como posibles responsables de la excreción de STEC y la presencia de Stx.

6.2.- Excreción de STEC

En la tabla 5 se advierte que del total de animales muestreados, 73/120 (60,83%) fueron identificados como excretores de STEC, de los cuales, 60 excretaron en una sola oportunidad, durante la duración del ensayo.

Animales excretores de STEC		
Animales (+) hasta 1 vez	60	82,19 %
Animales (+) hasta 2 veces	12	16,44 %
Animales (+) hasta 3 veces	1	1,37 %
Total	73	100%

Tabla 5: Distribución de la cantidad de animales de acuerdo al número de excreciones en el tiempo

Durante el mismo periodo, solamente 12 terneros excretaron STEC dos veces. Entre ellos, únicamente 2, lo hicieron en forma consecutiva.

Solamente 1 animal, fue individualizado excretando STEC en tres oportunidades, dos de las cuales en forma consecutiva.

En el gráfico 1 se puede apreciar la secuencia de la eliminación de STEC a lo largo del ciclo de engorde de los animales.

A partir del mes de marzo, cuando se realiza el primer HMRA (10,83% de prevalencia), hasta el mes de julio (0,84%), se percibe un decrecimiento mensual en la excreción de STEC. Durante este periodo, los terneros se encontraban en los corrales, consumiendo la dieta de recría.

Por falta de presupuesto para la compra de insumos, los HMRA del mes de agosto no se pudieron realizar.

En el mes de setiembre, cuando los animales se encontraban pastoreando en el campo, se observó un incremento significativo en la eliminación de STEC (15,25 % de prevalencia), manteniéndose hasta noviembre (15,25%), dejando constancia que, por los mismos motivos que en el mes de agosto, en octubre no se pudieron realizar los trabajos de diagnóstico.

Después de las altas prevalencias registradas en setiembre y noviembre, los animales son introducidos nuevamente a los corrales de encierre, conservando su distribución original, observándose una disminución en la excreción de STEC hasta el mes de enero de 2015 (0,85%).

Los trabajos de diagnóstico previstos para el mes de febrero y marzo también fueron suspendidos por problemas presupuestarios.

En el último HMRA, realizado en abril de 2015 (5,08%), previo a remitir los novillos al frigorífico, puede verse un incremento en la excreción de STEC.

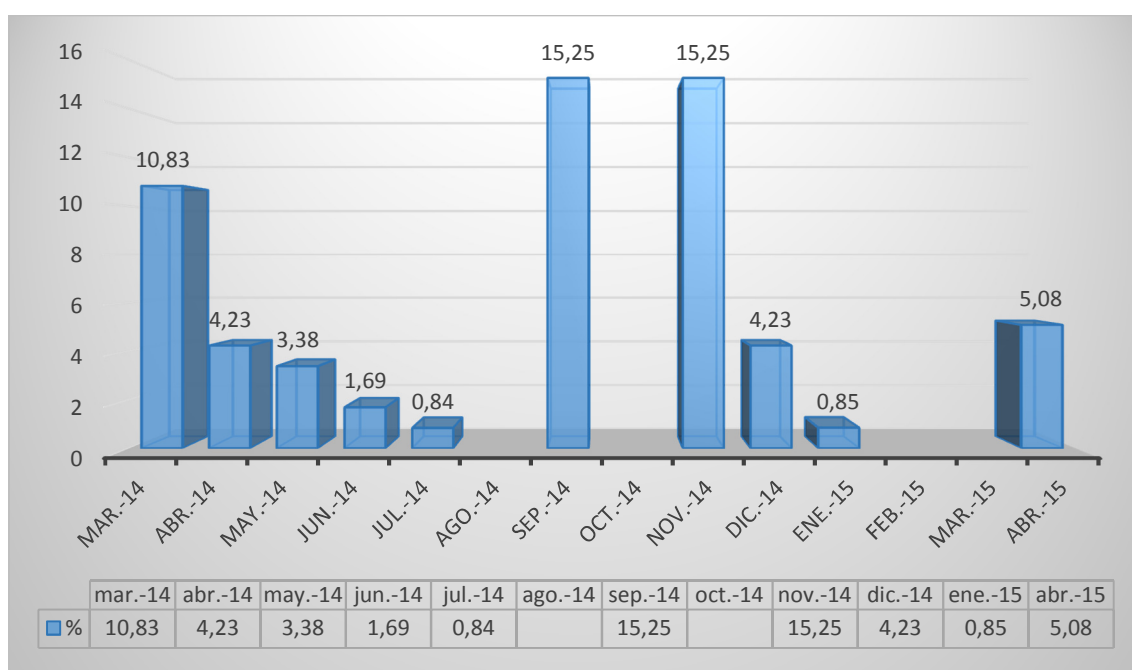


Gráfico 1: Secuencia de la eliminación de STEC de los animales excretadores, por fecha de HMRA, a lo largo del ciclo de engorde.

Acorde a la evaluación de los resultados del ensayo y al análisis de los datos obtenidos, se determinó que durante el desarrollo del mismo, las pruebas diagnósticas revelaron un nivel variable de animales excretando STEC desde el inicio del encierre, hasta el último muestreo.

6.3.- Presencia de Shiga toxinas

Se constató que el 100% de los animales identificados como excretores de STEC, portaban el gen *eae* de la región constante de Intimina y el gen *rfbO*₁₅₇, responsable de la síntesis del antígeno somático O. (Ver Tabla 2 del Anexo). En la misma tabla se aprecia la distribución en los corrales de los animales excretores de STEC.

Para describir la presencia de los genes que codifican las citotóxicas Shiga Stx1, Stx2 y Stx12 y la identificación de los genes de la región constante de Intimina (*eae*) de las STEC, diagnosticadas durante los tres periodos de engorde de los animales, se elaboró la tabla 6, en la cual se consignaron los distintos genes presentes. En base a esta tabla se determinó que el 10,83% de los animales excretaron STEC en el primer HMRA, portando genes para Stx1, Stx2 y la portación conjunta de los genes Stx1 y Stx2; mientras que en el último muestreo, solo el 5,08% de los animales resultaron excretores de STEC, portando solamente Stx2 y la portación conjunta de los genes Stx1 - Stx2.

	Recría				Campo			Terminación			Totales
	mar-14	abr-14	may-14	jun-14	jul-14	set-14	nov-14	dic-14	ene-15	abr-15	
<i>eae</i> -Stx 1	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>eae</i> -Stx 2	4	2	3	1	1	3	2	4	0	4	24
<i>eae</i> -Stx 12	5	0	0	1	0	15	16	1	1	2	41
TOTAL	13	5	4	2	1	18	18	5	1	6	73
%	10,83	4,23	3,38	1,69	0,84	15,25	15,25	4,23	0,85	5,08	

Tabla 6: Distribución a lo largo del año de la presencia de los genes *eae* y de Stx, en animales positivos a la Excreción de E. coli O157:H7, diagnosticados por fecha de HMRA.

En el grafico 2 se puede ver la distribución de las Shiga toxinas a lo largo del tiempo. Se observa que la presencia de Stx1 en terneros se registra solamente durante los tres primeros meses del ensayo y luego desaparece.

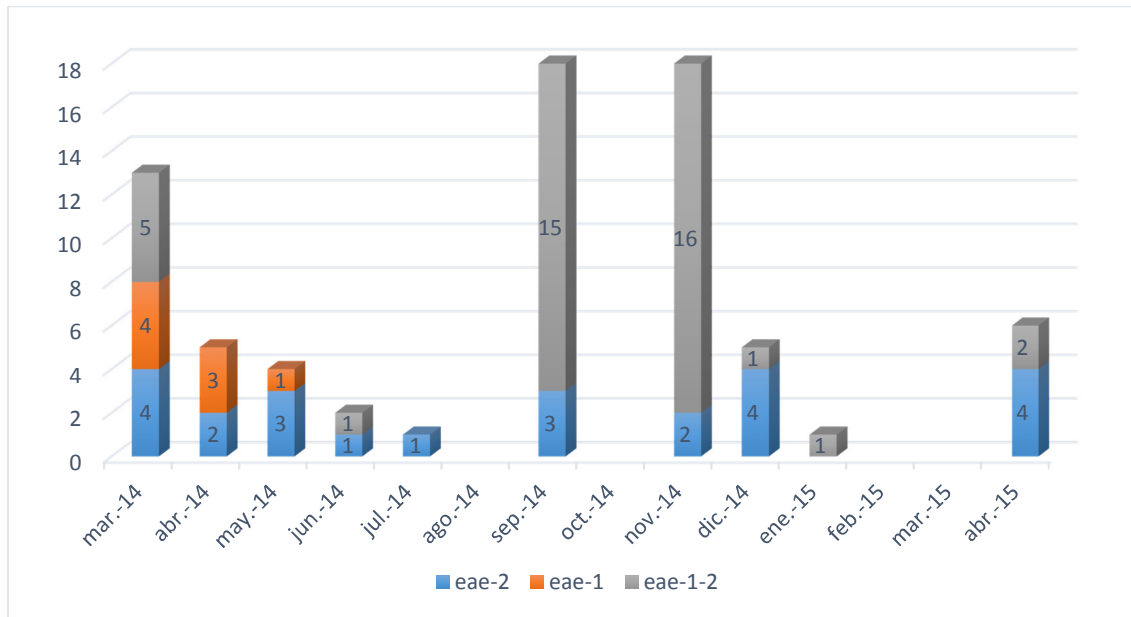


Gráfico 2: Distribución anual de la presencia de los distintos tipos de Stx durante el ensayo.

La presencia de Stx2 y Stx1 - Stx2 se detecta durante todo el periodo, con niveles variables, destacándose la presencia de Stx2 en 9 de 10 fechas de muestreo y la presencia de Stx1-Stx2 en 7 de 10, manifestándose particularmente elevada en los meses de setiembre y noviembre.

De los animales que excretaron STEC a lo largo de todo el ensayo, se encontró que el 11% de las cepas aisladas portaban Stx1, el 33% portaban Stx2 y el 56% Stx1 y Stx2 (Gráfico 3).

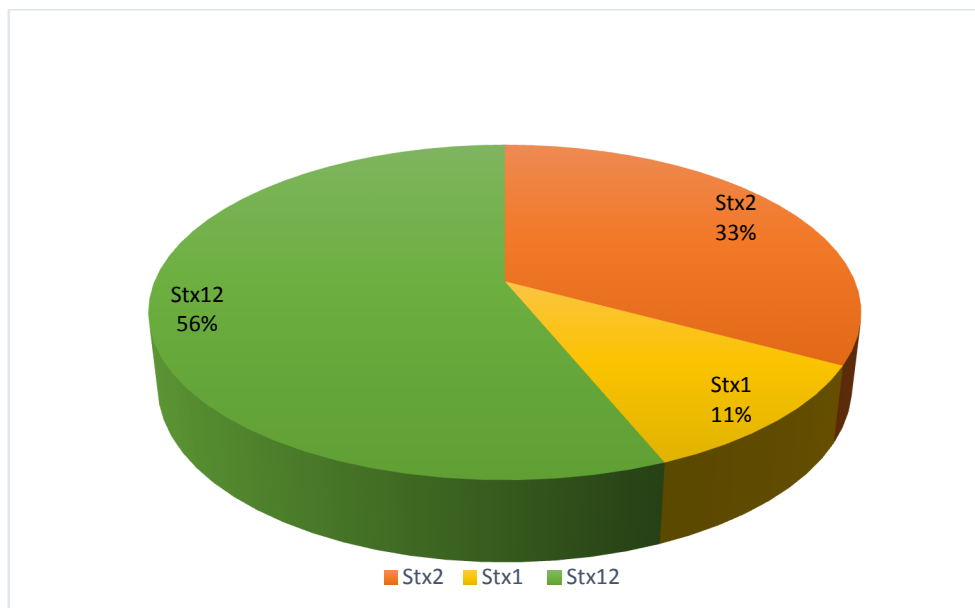


Gráfico 3: Distribución de los genes que codifican la expresión de las citotóxicas Shiga Stx1, Stx2 y Stx12

En la tabla 7 se individualizan a los animales que excretaron STEC en dos y tres oportunidades y se identifican las Shiga toxinas que portaban.

	803	787	764	595	721	718	797	704	758	701	773	710	765
mar-14										Stx2			Stx2
abr-14								Stx2			Stx1		Stx2
may-14						Stx1							
jun-14	Stx12												
jul-14	Stx2												
Ago-14	No se realizó muestreo												
Set-14		Stx2	Stx2	Stx12		Stx12	Stx12		Stx12	Stx12		Stx12	Stx12
Oct-14	No se realizó muestreo												
nov-14					Stx12		Stx12		Stx12		Stx12		
dic-14		Stx12	Stx2					Stx2				Stx12	
ene-15				Stx12									
Feb-14	No se realizó muestreo												
Mar-14	No se realizó muestreo												
abr-15					Stx12								

Tabla 7: Distribución de los animales que excretan STEC en 2 y 3 oportunidades, con la identificación de los genes que portan para la codificación de las Stx.

De los 12 animales que se identificaron excretando STEC en dos oportunidades, a lo largo del ensayo, se destacan 5 que excretaron STEC portando conjuntamente Stx1 y Stx2 (color rojo), en forma alternada, presumiendo que 2 de ellos (797 – 758) pudieron haber excretado en más de dos oportunidades, en forma consecutiva. Sin embargo, al no contar con los muestreos de octubre, no se puede confirmar. Dos portaron Stx1 y posteriormente Stx1-Stx2 (amarillo en la tabla). Otros 2 portaron Stx2 y luego Stx1-Stx2 (verde). Marcados con gris, se identificaron a 2 animales que eliminaron STEC portando Stx2 en dos oportunidades en forma alternada. Finalmente se identificó a un animal eliminando STEC portando en forma consecutiva, primero Stx1-Stx2 y un mes más tarde, Stx2 (color celeste).

Solo un animal, el N° 765, se identificó excretando STEC en tres ocasiones, de las cuales, 2 fueron en forma consecutiva, portando Stx2 (verde oliva) y en la tercera oportunidad, portando conjuntamente Stx1 y Stx2.

Se destaca que la presencia de los genes para la expresión de Stx2 se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo de encierre.

El animal N° 803 eliminó STEC portando conjuntamente Stx1 y Stx2 y Stx2 en forma consecutiva, durante el mes de junio y julio.

El animal N° 787 eliminó STEC portando Stx2 y Stx1-Stx2 en forma alternada, en los meses de setiembre y diciembre.

El animal N° 764 eliminó STEC portando Stx2 en forma alternada durante los meses de setiembre y diciembre.

El animal N° 595 eliminó STEC, portando conjuntamente Stx1 y Stx2 en forma alternada durante los meses de setiembre y enero de 2015.

El animal N° 721 eliminó STEC, portando conjuntamente Stx1 y Stx2 en forma alternada en los meses de noviembre y abril de 2015.

Se identificaron 2 animales, el N° 718 eliminando STEC y portando Stx1 y Stx1-Stx2 alternadamente, en los meses de mayo y setiembre; y al N° 797 con la portación conjunta de los genes Stx1 y Stx2 durante los meses de setiembre y noviembre.

Se halló al animal N° 704 eliminando STEC y portando Stx2, durante el mes de abril (etapa de recría) y en el mes de diciembre (etapa de terminación).

Se encontró al animal N° 758 eliminando STEC portando en forma conjunta los genes para Stx1 y Stx2 durante los meses de setiembre y noviembre.

Se identificó al animal N° 701 eliminando STEC portando genes de Stx2 en el mes de marzo y genes de Stx1 y Stx2 en forma conjunta en setiembre.

Se halló al animal N° 773 eliminando STEC portando genes de Stx1 en el mes de abril y portando genes en forma conjunta para Stx1 y Stx2 en el mes de noviembre.

Se detectó al animal N° 765 eliminando STEC portando genes de Stx2 en forma consecutiva en marzo y abril y Stx1 - Stx2 en el mes de setiembre.

El halló en el animal N° 710 la presencia conjunta de los genes para Stx1 y Stx2 en forma alternada durante setiembre y diciembre. (Tabla 1 Anexo).

En el grafico 4 se puede visualizar las tasas de genes para las Stx, presentes en las STEC excretadas por los animales a lo largo del ensayo.

En relación a la presencia de los genes que codifican la expresión de las citotoxinas, se advierte que la presencia conjunta de los genes para la Stx1 y Stx2 es significativamente mayor en los meses de setiembre y noviembre. (Ver tabla 4 Anexo).

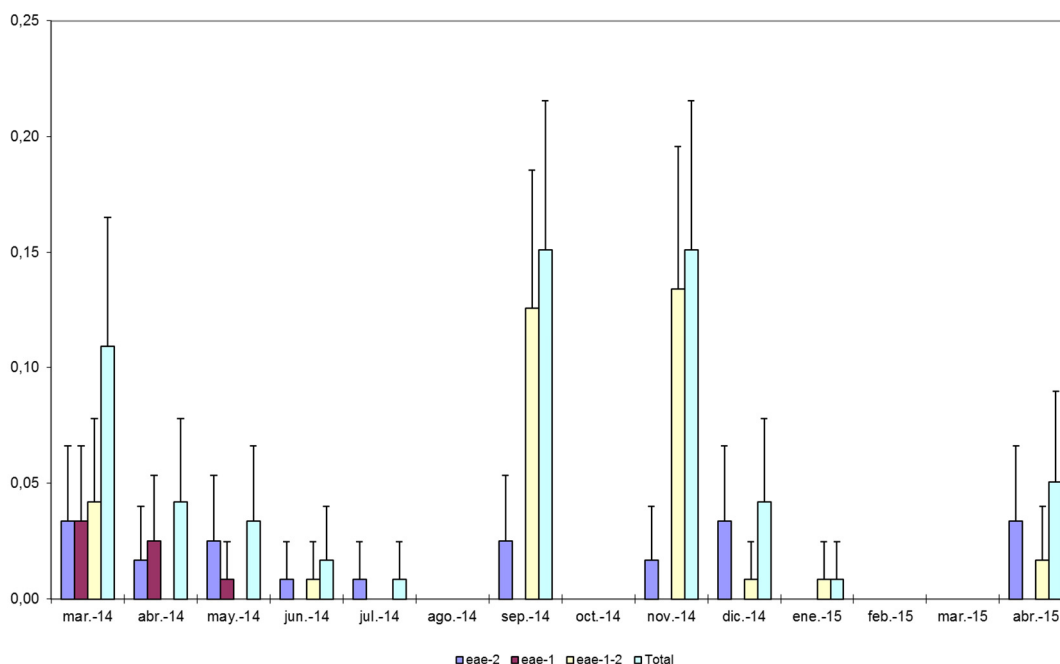


Gráfico 4: Análisis descriptivo mostrando en porcentaje, la proporción de animales excretores de STEC caracterizados por tipo de Stx presente.

6.4.- Distribución en los corrales de los animales excretores de STEC portando los genes de las diferentes Shiga toxinas

En las tablas 8 y 9 se observan la distribución de las citotoxinas portadas por las STEC, excretadas por los animales en los corrales, en los distintos periodos de alimentación.

	CORRALES																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Recría	1	12	2	12		2		2		1					1	1		
Campo													12.12				12	
	2	2			12	2	12	2			12	12				12	12.12	
Terminación				2.2		12	12	2	2		2	12					12	

Tabla 8: Distribución de las Stx en los corrales 1 al 18, donde 1= Stx1 - 2= Stx2 - 12 = Stx 12 - 12.12 indican 2 aislamientos de Stx12 y 12.12.12 12 indican 3 aislamientos de Stx12 (amarillo)- 2.2 indican 2 aislamientos de Stx 2 en un mismo corral.

En la etapa de recría se detectó en 20 corrales la excreción de STEC, de los cuales, solo en los corrales 23, 25 y 26 se identificaron más de un animal (2 en cada uno), eliminando STEC. Solo en el corral 23 se determinó la eliminación simultánea de 2

animales, sin embargo las Stx presentes en las cepas aisladas, correspondieron a expresiones genéticas distintas (Stx1 y Stx2).

	CORRALES																	
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Recría	12	12		12	2.1		12.2	2.2	2				2	1	2			1
Campo					12.12	2					12.12		12		12.12	12.12		
		12		12	12	12	12				12		2.12		12		12.2	12
Terminación							2											2

Tabla 9: Distribución de las Stx en los corrales 19 al 36, donde 12 = Stx 12 – 1= Stx1 – 2= Stx2 - 12.12 indican 2 aislamientos de Stx12 – 12.12.12 indican 3 aislamientos de Stx12 (amarillo) - 2.2 indican 2 aislamientos de Stx 2 - 12.2 indica la presencia de Stx12 y Stx2 - 2.1 indica la presencia de Stx2 y Stx1 en 1 mismo corral.

Si bien, durante el periodo de pastoreo a campo, los animales no estuvieron encerrados, se conserva su distribución en los corrales, para analizar la presencia de Stx en los excretos de STEC.

En la etapa de terminación se identificó en 10 corrales la excreción de STEC, de los cuales, solo en el corral 4, se encontró la presencia de 2 animales eliminando STEC en diferentes fechas de muestreo.

6.5.- Resultado de la probabilidad de excreción de STEC de acuerdo al peso y nivel de PB en la dieta.

La edad de los animales que ingresaron al ensayo estaba comprendida entre 4 y 6 meses, con un peso promedio de 169 kg, con un valor mínimo de 87 y un máximo de 224 kg. Por tal motivo fueron distribuidos por peso en dos bloques: livianos y pesados. Para lo cual se usaron 36 corrales, incluyendo 3 o 4 animales en cada uno de ellos, quedando de esta manera, 18 corrales para animales livianos, con 128 kg de promedio y 18 corrales para los pesados, con 197 kg de promedio.

En la tabla 10 se consignaron los datos del número de animales que excretaron STEC en cada etapa de engorde, de acuerdo al nivel de PB de la dieta, separándolos de acuerdo al peso, en livianos y pesados.

	Recría				Campo	Terminación		Tot
	39	39	40	118	118	58	59	
Nivel PB	9%	13%	18%	Tot	9%	9,5%	13%	
Livianos	4/20	1/20	3/20	8	9/60	5/29	10/30	15
Pesados	6/19	6/19	3/20	15	10/58	8/29	8/29	16

Tabla 10: Distribución de la excreción de STEC por etapa de engorde, nivel de proteína y peso de los animales.

De acuerdo al ordenamiento de los datos en esta tabla, en el periodo de recría se observa un elevado número de animales pesados excretando STEC, a diferencia de los animales livianos, en los cuales se aprecia un bajo número de excretores.

Por otro lado, tanto en el periodo de pastoreo a campo como en la etapa de terminación, los registros de la excreción de STEC entre animales livianos y pesados tienen valores similares.

6.6.- Relación de los pesos (livianos y pesados) de los animales con la excreción de STEC durante el periodo de recría, campo y terminación.

El análisis en relación a los pesos, usando una prueba de asociación por Chi cuadrado, determinó en los animales clasificados como livianos, un aumento de la excreción de STEC en el periodo de terminación, mientras que los animales pesados no presentan diferencias en la excreción de STEC durante el mismo periodo (Tabla 11).

Peso	Recría	Campo	Terminación	Totales
Livianos +	8	9	15	32
Livianos -	52	51	45	148
Pesados +	15	10	16	41
Pesados -	43	48	42	133
Totales	118	118	118	354

Tabla 11: Análisis en relación a los pesos, se detecta en animales livianos mayor excreción de STEC durante la terminación. Los animales pesados no presentan diferencias en la excreción.
Chi: 5,246 P: 0,5125 NS

La excreción de STEC en relación a las 3 fases del engorde, recría (considerando los 3 niveles de PB 9 – 13 – 18%), campo (9% PB) y terminación (9,5 – 13% PB), usando una prueba de asociación por Chi cuadrado, no dio resultados significativos. Analizando solamente la dieta de recría, conteniendo el 13% de PB, las diferencias observadas entre animales livianos y pesados, si bien importantes (1/20 y 6/19 respectivamente), no son significativas.

En la fase de terminación, la relación de la excreción de STEC con respecto al porcentaje de PB en la dieta, no presenta desvíos significativos de las proporciones esperadas, entre los animales que consumieron una dieta con 9,5 y 13% de PB, tanto livianos como pesados (Tabla 12).

Peso	9,5% PB	13% PB	Totales
Livianos +	5	10	15
Livianos -	24	20	44
Pesados +	8	8	16
Pesados -	21	21	42
Totales	58	59	117

Tabla 12: Con respecto al porcentaje de PB en la dieta, la excreción de STEC entre los animales, tanto livianos como pesados, que consumieron una dieta con 9,5 y 13% de PB, no presenta desvíos significativos.
Chi: 2,0219 P: 0,5678 NS

6.7.- Presencia de genes de Shiga toxinas de acuerdo al nivel de PB por etapa de engorde

En la tabla 13 se puede apreciar la distribución de los genes de los factores de toxicidad (Stx), presentes en las STEC excretadas en cada etapa de engorde, de acuerdo al nivel de PB de la dieta.

Nº Anim	Recría			Campo	Terminación	
	39	39	40	118	58	59
PB	9%	13%	18%	9%	9,50%	13%
Stx1	3	2	3	0	0	0
Stx2	4	4	3	5	4	4
Stx12	4	2	0	31	1	3

Tabla 13: Relación del nivel de PB de la dieta con la presencia de Stx en cada etapa de engorde.

En los animales que consumen la dieta de recría con un nivel del 9% de PB, se destaca que la presencia de Stx12 tiene valores más elevados que los que consumen la dieta con 13% y 18% de PB.

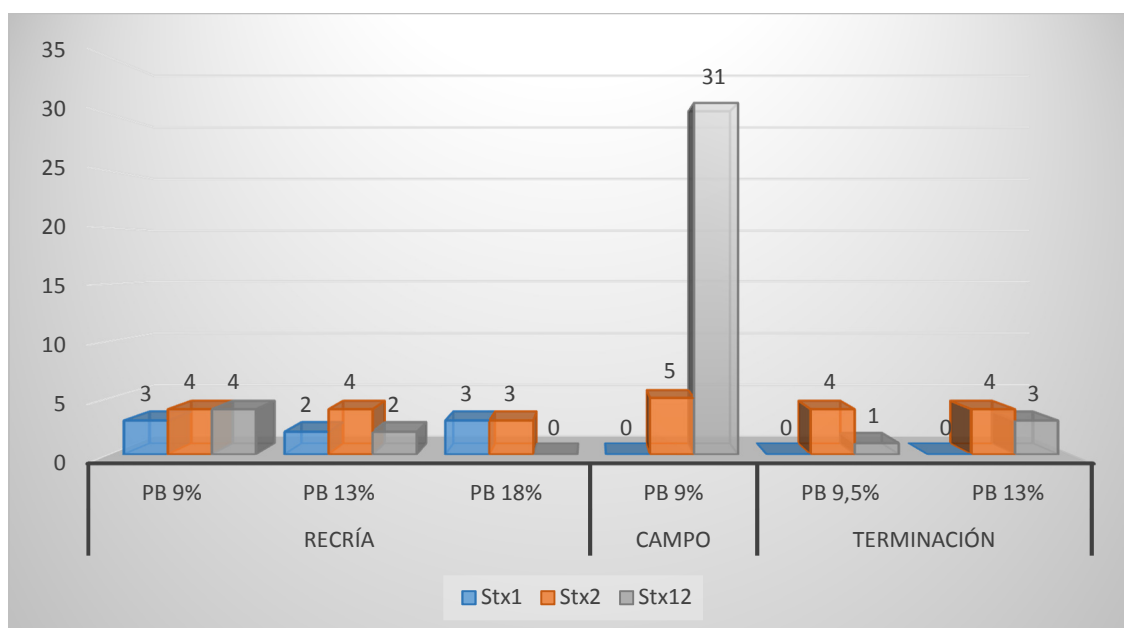


Gráfico 5: Relación del nivel de PB de la dieta en cada etapa del ciclo de engorde con la presencia de Stx1 – Stx2 – Stx12.

En el gráfico 5 se observa que los terneros, al inicio de la recría, excretan STEC portadoras de Stx1, Stx2 y Stx1-Stx2. Por otro lado, se destaca en los animales que pastorearon en el campo, una elevada excreción de STEC portadoras en forma conjunta de Stx1-Stx2, que disminuye luego, cuando los animales reingresan a los corrales.

Durante la etapa de terminación se registraron animales con una baja excreción de STEC portadoras de Stx1-Stx2, con valores similares a los registrados en la etapa de recría. Después del periodo de recría, no se vuelve a identificar la presencia de Stx1 y la aparición de Stx2 se mantiene constante, con pocas variaciones.

6.7.1.- Relación de los genes que codifican la expresión de las Stx con los periodos de recría, campo y terminación

La asociación entre la presencia de los genes que codifican la expresión de las Stx con los periodos de recría, campo y terminación a los que fueron sometidos los animales, indicó diferencias entre los tres momentos del ensayo (Tabla 14).

Toxina	Recría	Campo	Terminación
Stx1	8	0	0
Stx2	11	3	8
Stx12	6	15	4

Tabla 14: Análisis comparativo de la presencia de los factores de toxicidad durante recría, campo y terminación
Chi: 22,8846 P: 0,000836

En la tabla 15 pueden apreciarse los resultados del análisis comparativo entre recría versus campo y terminación, usando una prueba de asociación por Chi cuadrado, de los cuales se desprenden diferencias significativas, debido a que **la Stx1** aparece solamente durante este periodo y luego desaparece y **la Stx1-Stx2** es más frecuente durante las dos últimas etapas.

Toxina	Recría	Campo y Terminación
Stx1	8	0
Stx2	11	11
Stx12	6	19

Tabla 15: Análisis comparativo de la presencia de Stx entre recría versus campo y terminación.
Chi 66,6875 P<0,0001

Analizando las etapas de campo y terminación, en la tabla 16 se destaca que la presencia de Stx1 - Stx2 se manifiesta significativamente más durante la etapa de pastoreo, en tanto que la Stx2 se manifiesta más durante la etapa de terminación.

Toxina	Campo	Terminación
Stx1	0	0
Stx2	3	8
Stx12	18	12

Tabla 16: Análisis comparativo de la presencia de Stx entre campo y terminación.
Chi 17,0956938 0,00067543

A su vez, surge del análisis, que la Stx2 se mantiene presente en los tres periodos de alimentación.

6.8.- Registros climáticos

6.8.1.- Temperaturas

El régimen térmico de la provincia de La Pampa, república Argentina, se distingue por poseer un clima templado continental, con temperaturas diarias que oscilan entre 20 y 25°C en verano, pudiendo, por la sequedad del clima, registrarse temperaturas extremas, superiores a los 32°C (Casagrande et al, 2012).

En invierno, las temperaturas diarias oscilan entre 16°C y -6°C, pudiendo registrarse temperaturas extremas por debajo de los -10°C.

	19 mar	21 abr	13 may	10 jun	07 jul	11 ago	10set	11-oct	04-nov	09-dic	12en	11-feb	15ma	07-abr
Lluvia	42	43,4	16	2	8	0	40,4	106,3	97,1	29	17	78	23	17,8
TºMax	23,7º	19,2º	18º	13º	9º	16,5º	15,6º	24ºC	26º	26º	32º	32º	30,5º	26,5º
TºMin	3,0º	2,9º	3º	-3º	-6º	- 5ºC	-5º	0,9ºC	3,5º	11º	11º	11º	15º	6,3º
Tº C X	14,9º	10,05	10,6º	5,3º	0,9º	6,4º C	7,4º	10,88º	14,4º	22,4º	23º	21,9º	22,26	15,6º

Tabla 17: Registro del promedio de las de las temperaturas máximas, mínimas y medias, 15 días previos a cada HMRA.

A través del análisis de los registros de las temperaturas, efectuados a las 01 hs – 06 hs - 08 hs – 10 hs, durante 15 días previos a cada HMRA, a lo largo de todo el ciclo de engorde, se elaboró la tabla 17 y el gráfico 6 (EEA, Estación Meteorológica INTA Anguil, 2014/15), en los cuales se consignaron los promedios de las temperaturas máximas, mínimas y medias, para poder determinar si factores relacionados con el clima estaban asociados a la excreción de STEC.

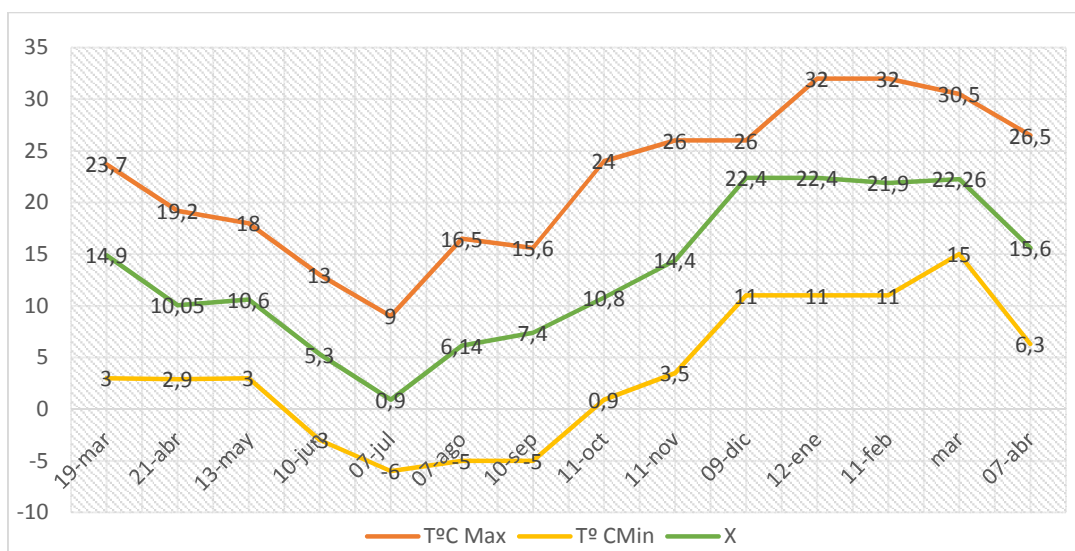


Gráfico 6: Promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias, tomadas 15 días previos a cada HMRA.

6.8.2.- Relación entre temperatura y excreción de STEC

Con los registros de los promedios de las temperaturas máximas, mínimas y medias, obtenidas 15 días previos a cada HMRA, se elaboró la tabla 18 y el gráfico 7, para comprobar si estos factores estaban asociados con el número de animales eliminando STEC.

	mar-14	abr-14	may-14	jun-14	jul-14	ago-14	sep-14	oct-14	nov-14	dic-14	ene-15	feb-15	mar-15	abr-15
STEC	13	5	4	2	1	s/d	18	s/d	18	5	1	s/d	s/d	6
TºC Max	23,7	19,2	18	13	9	9	15,6	24	26	26	32	32	30,5	26,5
TºC Min	3	2,9	3	-3	-6	-5	-5	0,9	3,5	11	11	11	15	6,3
X	14,9	10,05	10,6	5,3	0,9	6,14	7,4	10,8	14,4	22,4	22,4	21,9	22,26	15,6

Tabla 18: Relación de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la excreción mensual de STEC.

El análisis del gráfico 7 permite observar que a partir de marzo hasta julio de 2014, a medida que disminuyen las temperaturas máximas, medias y mínimas, disminuye la excreción de STEC.

Desde agosto hasta noviembre, independientemente de las temperaturas mínimas, se percibe que a medida que aumentan las temperaturas medias y máximas, se incrementa la excreción de STEC.

A partir del mes de diciembre comienza a aumentar la temperatura máxima, superando los 30°C, en los meses de enero, febrero y marzo de 2015. Las temperaturas medias y mínimas se estabilizan en el mismo periodo y comienzan a bajar a partir de marzo, del mismo modo que lo hace la temperatura máxima. Durante ese lapso de tiempo no se observa una variación importante en la excreción de STEC.

En el HMRA del mes de abril de 2015, coincidiendo con la disminución de las temperaturas, la excreción de STEC no registra diferencias, comparándola con los resultados del mes de diciembre.

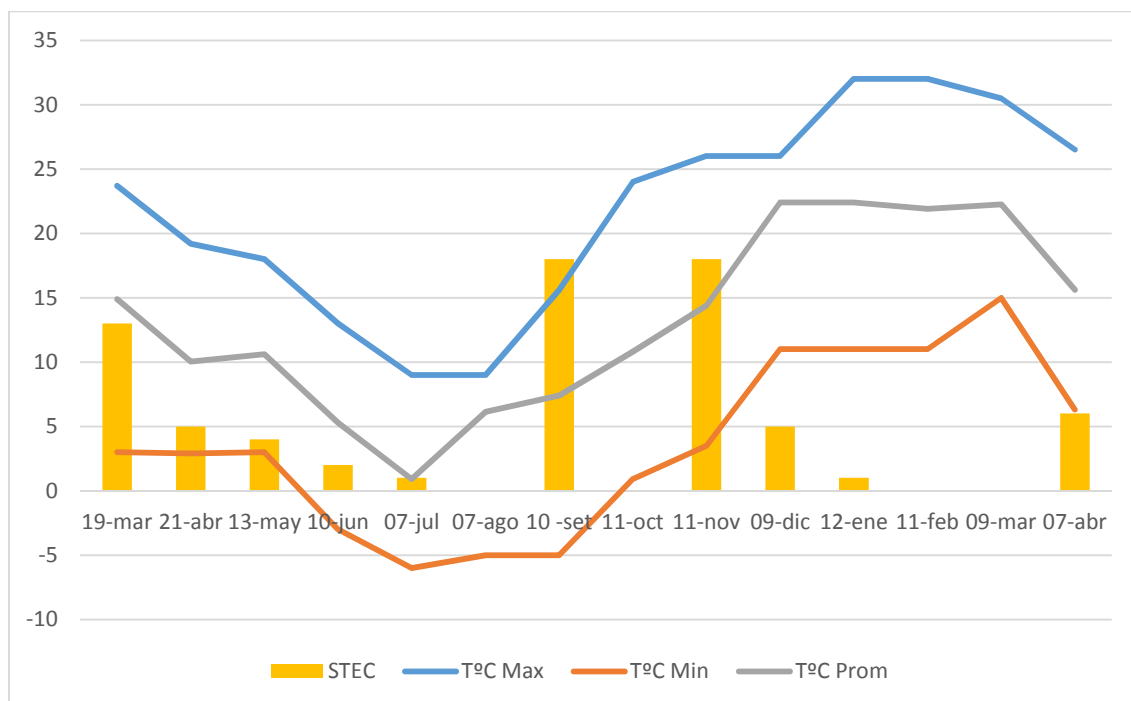


Gráfico 7: Relación de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la excreción mensual de STEC.

6.8.3.- Relación entre temperatura y presencia de los genes de Stx

Con los registros del promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias, obtenidas 15 días previos a cada HMRA, se elaboró la tabla 19 y el gráfico 8, para ver la relación de las temperaturas con la presencia de animales excretores de STEC portando los distintos genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

	19 mar	21 abr	13 may	10 jun	07 jul	11 ago	10 set	11 oct	04 nov	09 dic	12 ene	11 feb	15 mar	07 abr
Lluvia	42	43,4	16	2	8	0	40,4	106,3	97,1	29	17	78	23	17,8
TºMax	23,7º	19,2º	18º	13º	9º	16,5º	15,6º	24ºC	26º	26º	32º	32º	30,5º	26,5º
TºMin	3,0º	2,9º	3º	-3º	-6º	-5ºC	-5º	0,9ºC	3,5º	11º	11º	11º	15º	6,3º
Tº C X	14,9º	10,05	10,6º	5,3º	0,9º	6,4º C	7,4º	10,88 º	14,4º	22,4º	23º	21,9º	22,26	15,6º
Stx2	4	2	3	1	1	s/d	3	s/d	2	4	0	s/d	s/d	4
Stx1	4	3	1	0	0	s/d	0	s/d	0	0	0	s/d	s/d	0
Stx12	5	0	0	1	0	s/d	15	s/d	16	1	1	s/d	s/d	2

Tabla 19: Relación entre las temperaturas máximas, mínimas y medias con la presencia de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

A partir del análisis del gráfico 8 se pueden comparar los datos de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la presencia de Shiga toxinas.

Desde marzo hasta mayo de 2014, a medida que bajan las temperaturas, se observa una disminución de la presencia de Stx1 y a partir de junio, hasta finalizar en ensayo, no se la vuelve a identificar. En el periodo comprendido entre marzo y julio, con la disminución de las temperaturas, se aprecia también una disminución de la presencia de las Stx2 y la presencia conjunta de las Stx1 - Stx2.

A partir de julio, independientemente de las temperaturas mínimas, con el aumento de las temperaturas medias y máximas, se detecta en los HMRA de los meses de setiembre y noviembre, un significativo incremento de la presencia de genes de para los factores de virulencia de las Stx1 - Stx2.

Desde diciembre hasta el mes de marzo de 2015, se registraron temperaturas máximas, mínimas y medias elevadas. Durante ese lapso de tiempo, se realizaron solamente los HMRA de diciembre y enero, detectándose una disminución en la presencia conjunta de Stx1 - Stx2.

El muestreo del mes de abril, momento en que nuevamente se marca un descenso de las temperaturas, se detecta la presencia conjunta de Stx1 - Stx2 con niveles similares al mes de diciembre.

Por otro lado, durante el mismo periodo, la presencia de Stx2 se mantiene, no registrándose su presencia en los HMRA realizados en el mes de enero.

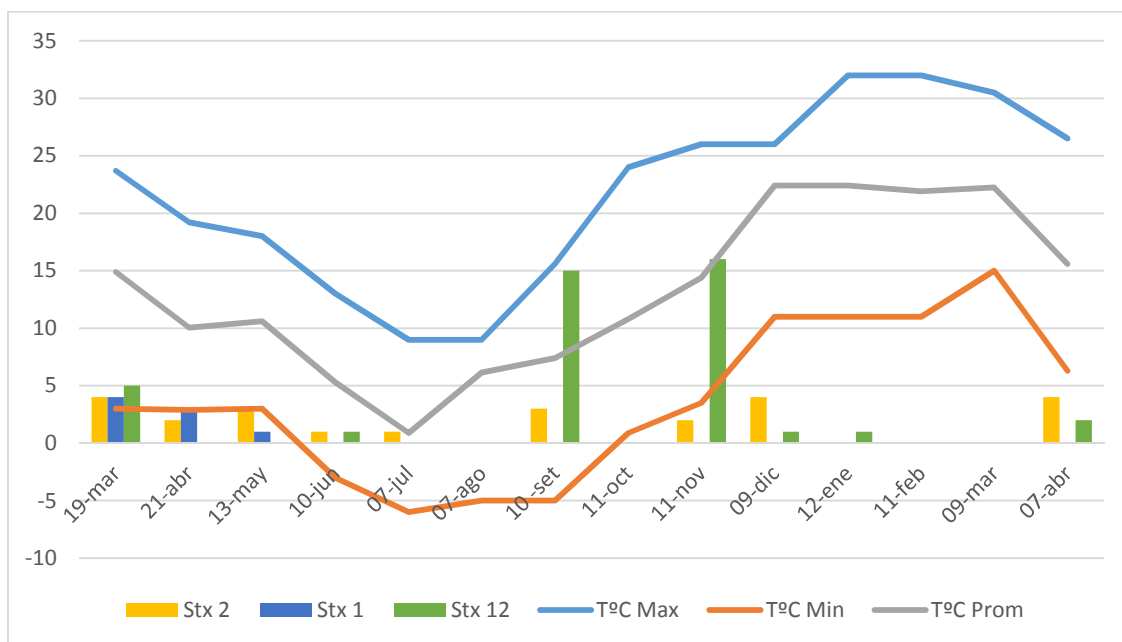


Gráfico 8: Relación del promedio de las temperaturas máximas, mínimas y medias con la presencia de Stx en los HMRA mensuales.

6.9.- Precipitaciones

Las lluvias en la EEA del INTA Anguil, según el resumen promedio de precipitaciones, correspondientes al periodo 1973 – 2012, realizado por Casagrande, G. A., en 2012, determina inviernos secos y veranos húmedos.

Con los datos de los registros de las precipitaciones durante el periodo de engorde de los animales, se obtuvo la tabla 20 y el gráfico 9, en los cuales se ajustaron las lluvias acumuladas que incidían 15 días previos a las fechas cada muestreo.

Precipitaciones acumuladas 15 días previos al HMRA													
19 mar	21 abr	13 may	10 jun	7 jul	7 ago	10 set	11 oct	11 nov	9 dic	12 ene	11 feb	15 mar	7 abr
42	43,4	16	2	8	0	40,04	106,3	97,01	29	17	78	23	17,8

Tabla 20: Registro de las precipitaciones acumuladas en mm, 15 días previos al HMRA

El análisis de estos datos, obtenidos previo a los HMRA, permitió determinar que durante el periodo de ensayo se registraron precipitaciones superiores a la media histórica anual (1064,7 mm versus 746,2 mm en el período 1973-2015, E. M. de la E.E.A INTA Anguil).

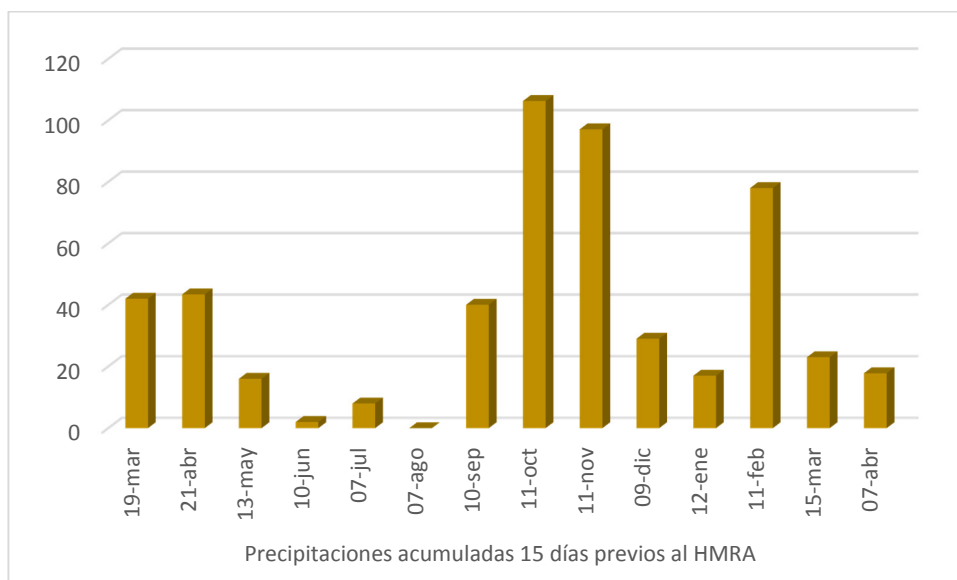


Grafico 9: Distribución de las precipitaciones 15 días previos al HMRA

Con el objetivo de realizar un análisis estacional, se tomaron los registros de las lluvias, desde marzo de 2014 hasta junio de 2015 y se distribuyeron por estación. Se incluyeron a su vez, el resumen promedio de precipitaciones estacionales, correspondientes al periodo 1973 – 2015, (E. M. de la E.E.A INTA Anguil) y el registro promedio de las precipitaciones 15 días previos a cada HMRA, para poder comparar la incidencia de las lluvias durante el ensayo con los registros históricos. (Tabla 21 y gráfico 10).

Precipitaciones en mm					
	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
2014/1015	242,4	147,4	304,6	237	133,3
1973/2015	67,6	22	68,4	93,4	67,6
HRMA	59,4	10	272	124	40,8

Tabla 21: Distribución de las precipitaciones, desde marzo 2014 hasta junio 2015 y los promedios del periodo 1973 – 2015, distribuidas por estaciones (Estadísticas agroclimáticas de la EEA Anguil) y el registro promedio de las precipitaciones 15 días previos a cada HMRA.

En base a este análisis, se destacan abundantes lluvias estacionales durante todo el ensayo, mostrando un comportamiento atípico con respecto a los promedios históricos del periodo 1973 – 2015, en el cual, los registros pluviométricos son mayores durante el

verano. Finalmente podemos decir que las precipitaciones durante todo el ciclo de engorde, excedieron los valores históricos.

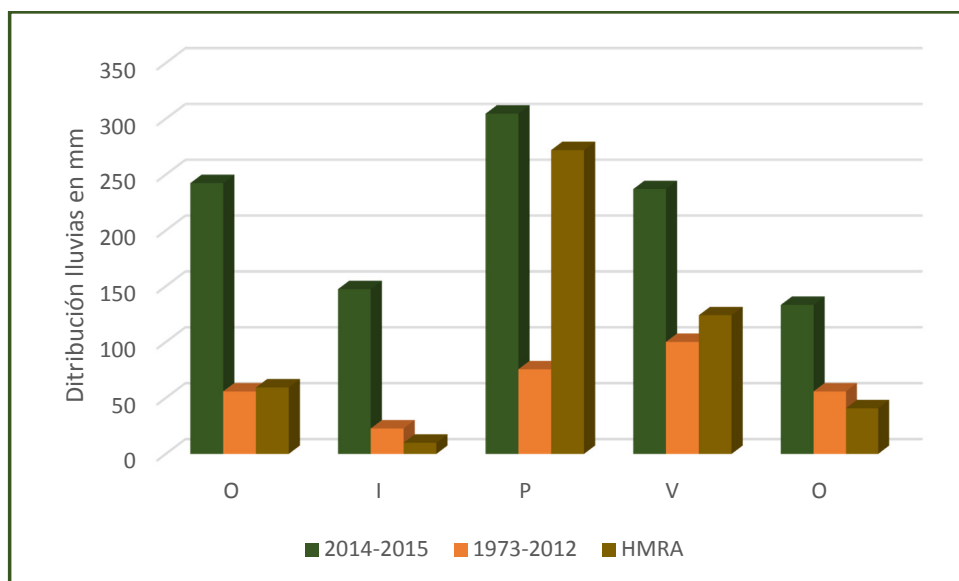


Gráfico 10: Distribución de las precipitaciones acumuladas, desde marzo 2014 hasta junio 2015 y resumen de los promedios del periodo 1973 – 2012, distribuidas por estaciones (Casagrande, G. A.; Deanna, M. E.; Farrell, A.; Babinec, F., Estadísticas agroclimáticas de la EEA Anguil, Publicación Técnica N° 88, Ediciones INTA, Agosto 2012) y el registro promedio de las precipitaciones 15 días previos a cada HMRA.

Se subraya que casi la totalidad de las precipitaciones registradas en primavera, ocurrieron durante los 15 días previos a la toma de muestras.

6.9.1.- Relación entre las precipitaciones y la excreción de STEC

Con los datos de los registros de las lluvias acumuladas, se confeccionó la tabla 22, con el objetivo de relacionar la posible incidencia de las precipitaciones con la excreción mensual de STEC.

	19-mar	21-abr	13-may	10-jun	07-jul	07-ago	10 -set	11-oct	11-nov	09-dic	12-ene	11-feb	15-mar	07-abr
Precipit	42	43,4	16	2	8	0	40,04	106,3	97,1	29	17	78	23	17,8
STEC	13	5	4	2	1	s/d	18	s/d	18	5	1	s/d	s/d	6

Tabla 22: Relación entre las precipitaciones y la excreción de STEC.

El gráfico 11 permite visualizar que, coincidentemente con la ocurrencia de precipitaciones, se percibe una mayor excreción de STEC, destacándose los meses de setiembre y noviembre, durante los cuales se detectó la mayor excreción de todo el ensayo.

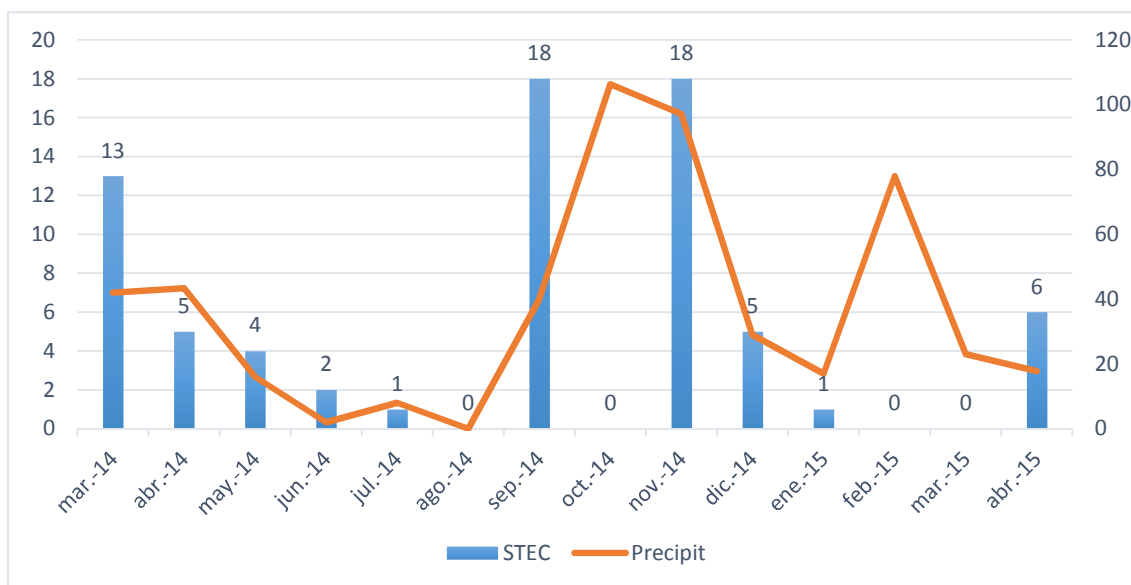


Gráfico 11: Relación entre las precipitaciones y la excreción de STEC.

6.9.2.- Relación entre las precipitaciones y la presencia de las diferentes Stx

Con los datos de los registros de las lluvias acumuladas, se confeccionó la tabla 23, para comparar la posible incidencia de las precipitaciones con la presencia de los genes que codifican los factores de toxicidad Shiga.

	19-mar	21-abr	13-may	10-jun	07-jul	07-ago	10-set	11-oct	11-nov	09-dic	12-ene	11-feb	15-mar	07-abr
Precipit	42	43,4	16	2	8	0	40,04	106,3	97,1	29	17	78	23	17,8
Stx-2	4	2	3	1	1	s/d	3	s/d	2	4	0	s/d	s/d	4
Stx-1	4	3	1	0	0	s/d	0	s/d	0	0	0	s/d	s/d	0
Stx-1-2	5	0	0	1	0	s/d	15	s/d	16	1	1	s/d	s/d	2

Tabla 23: Relación entre las precipitaciones y la presencia de los genes que codifican los factores de toxicidad Shiga.

En el gráfico 12 se visualiza claramente una mayor presencia de genes Stx coincidiendo con los meses en los que se registraron mayores precipitaciones, disminuyendo a medida que los registros pluviométricos son menores.

A partir del mes de marzo de 2014, se observa que a medida que disminuyen los registros pluviométricos, se reduce la presencia de los genes que codifican la expresión de Stx1, Stx2 y Stx1 - Stx2. Durante los meses de junio y julio, con registros de lluvia muy bajos, la detección de Stx es coincidentemente reducida.

Durante los meses de setiembre y noviembre se registraron abundantes precipitaciones, detectándose un aumento moderado de la presencia de Stx2 y un significativo incremento de la presencia conjunta de Stx1 y Stx2.

Posteriormente, a partir de diciembre, con un registro menor de lluvias, se advirtió una disminución de la presencia de genes de Stx1 - Stx2 y un registro moderado de Stx2.

En el HMRA de enero de 2015, con pocas lluvias, se detectó solamente la presencia conjunta de Stx1 y Stx2.

En el mes de abril de 2015, también con bajas precipitaciones, se registró una moderada presencia de los genes que codifican los factores de toxicidad Stx2 y Stx1 - Stx2.

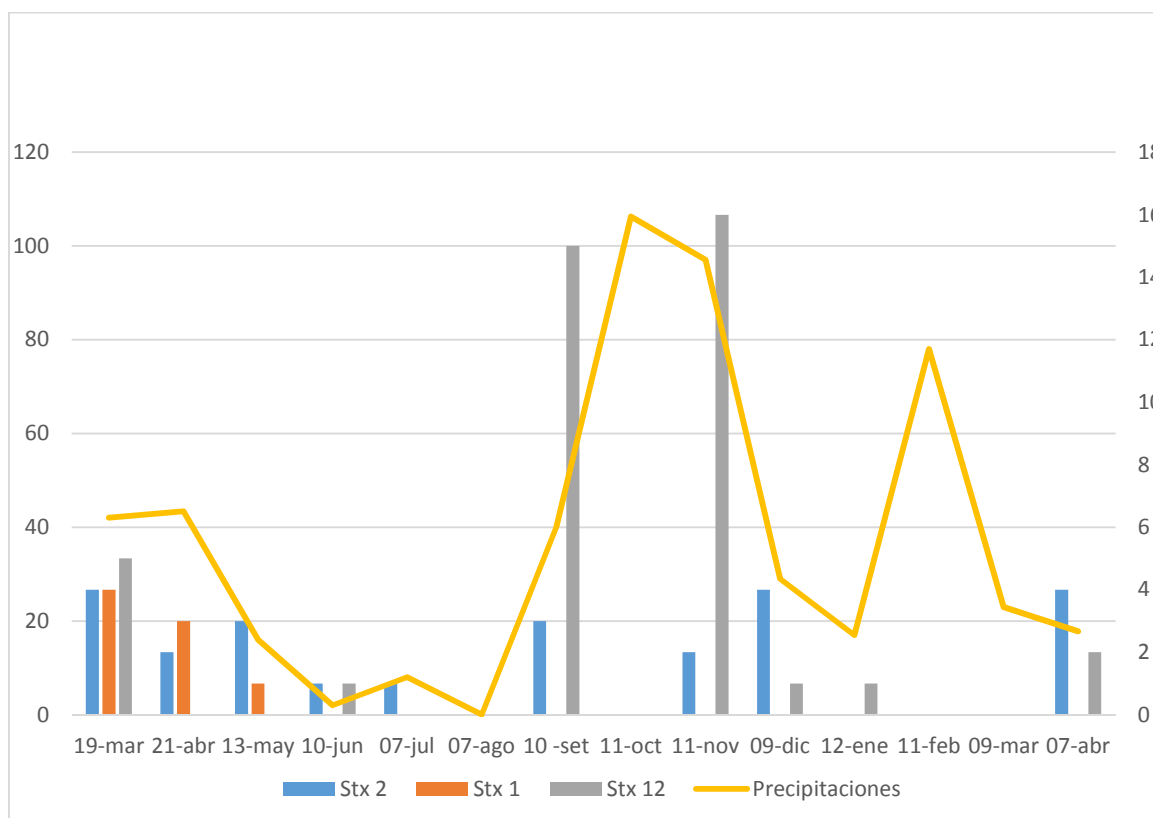


Gráfico 12: Relación entre las precipitaciones y la presencia de los genes que codifican los factores de toxicidad Shiga.

6.10.- Relación de los factores climáticos (lluvia y temperatura) con la excreción de STEC

Se encontró una relación significativa entre las lluvias, temperatura mínima y la temperatura media, mediante una regresión Poisson (Tabla 24). Los coeficientes de lluvias y temperatura media son positivos, lo que indica que cuando estas aumentan, también lo hace la excreción de STEC. Sin embargo, la interpretación del coeficiente para temperatura mínima, que es negativo, no es claro, ya que estaría indicando que la excreción aumentaría a menores temperaturas.

Parámetros	DF	Estimado	Error	χ^2	Pr > χ^2
Intercept	1	-10.7680	0.7571	202.31	<.0001
Lluvia	1	0.0161	0.0039	17.24	<.0001
Tº Min	1	-0.2765	0.0732	14.25	0.002
Tº Med	1	0.2266	0.0716	10.01	0.0016
Escala	0	1.0000	0.0000		

Tabla 24: Estimaciones de los parámetros utilizando Máxima Verosimilitud, los coeficientes de lluvias y temperatura máxima son positivos, lo que indica que cuando estas aumentan, también lo hace la excreción de STEC.

6.11.- Relación de los factores climáticos (lluvia y temperatura) con la presencia de los genes de virulencia Stx.

Cuando se analizaron los datos correspondientes a los registros de las temperaturas y las precipitaciones, para determinar si estos factores climáticos influyen sobre la presencia de los genes que codifican la expresión de la **Stx1**, también mediante una regresión Poisson (tabla 25), no se encontró relación con ninguna de las variables climáticas, lluvia, temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura media.

Parámetros	DF	Estimado	Error	χ^2	Pr > χ^2
Intercept	1	-9.0027	2.6209	11.80	0.0006
Lluvia	1	0.0149	0.0160	0.86	0.3524
Tº Max	1	-0.0411	0.2053	0.04	0.8413
Tº Min	1	0.1550	0.2475	0.39	0.5312
Tº Med	1	-0.0974	0.2633	0.14	0.7114
Escala	0	1.0000	0.0000		

Tabla 25: Estimaciones de los parámetros utilizando Máxima Verosimilitud. No hay relación entre las variables climáticas con la expresión de los genes que codifican a la Stx1.

Situación ésta que se explicaría porque la Stx1 solo fue registrada en los tres primeros HMRA, estando ausente en los posteriores.

Tampoco se encontró relación de las temperaturas y las precipitaciones, con la presencia de los genes que codifican la expresión de la **Stx2**, usando la misma metodología estadística (Tabla 26).

Parámetros	DF	Estimado	Error	X ²	Pr > X ²
Intercept	1	-9.0442	1.4945	36.62	<.0001
Lluvia	1	0.0052	0.0098	0.28	0.5940
Tº Max	1	0.0776	0.1033	0.57	0.4522
Tº Min	1	0.0430	0.1360	0.10	0.7520
Tº Med	1	0.1262	0.1393	0.82	0.3648
Escala	0	1.0000	0.0000	36.62	<.0001

Tabla 26: Utilizando Estimaciones de los parámetros de Máxima Verosimilitud no se encontró relación de las temperaturas y las precipitaciones, con la presencia de los genes que codifican la expresión de la Stx2.

No obstante, se enfatiza que la presencia de los genes para la expresión de la Stx2 se registró en forma regular, a lo largo de todo el periodo de engorde. Esta situación debe tenerse en cuenta, por la toxicidad de esta Stx y su incidencia en los casos de SUH observados en la Argentina.

Al analizar, con la misma metodología, se encontró que la relación entre las temperaturas y las precipitaciones con la presencia de los genes que codifican la expresión conjunta de la **Stx1 y Stx2**, era significativa. Los coeficientes para la lluvia y la temperatura media fueron positivos, lo que indica que si aumenta la lluvia y/o la temperatura media, aumenta la presencia de Stx1 - Stx2. El coeficiente para temperatura mínima nuevamente fue negativo, lo que implica que a menor temperatura aumentaría también la expresión de Stx12 (Tabla 27).

Parámetros	DF	Estimado	Error	X ²	Pr > X ²
Intercept	1	-15.2109	1.9161	63.02	<.0001
Lluvia	1	0.0281	0.0056	25.05	<.0001
Tº Min	1	-0.6090	0.1497	16.55	<.0001
Tº Med	1	0.5176	0.1608	10.36	0.0013

Tabla 27: Estimaciones de parámetros utilizando Máxima Verosimilitud se encontró que la relación entre temperaturas y precipitaciones con la presencia de Stx12 es significativa.

Una posible interpretación a este comportamiento, podría ser la influencia de la amplitud térmica, lo que debería confirmarse en nuevos estudios.

6.12.- Factores de manejo

Desde el comienzo del ensayo, los terneros fueron sometidos a distintas medidas de manejo. Destete previo al ingreso a los corrales, inicio del consumo de la dieta de recría, castración quirúrgica, inmunizaciones contra fiebre aftosa, cambio de dieta con la salida al campo y reingreso posterior al encierre, con consumo de dieta de terminación.

En la tabla 28 se detallan los factores de manejo a los que se sometió a los animales en cada periodo del engorde, para indagar sobre los posibles efectos del estrés emergente, como factores responsables de la excreción de STEC y la presencia de los genes de Stx.

Factores de estrés que afectaron a los animales			
Recría	Campo	Acostumbramiento	Terminación
19 marzo 2014 – 10 junio Dieta recría	11 junio – 24 octubre Pastoreo a campo	25 octubre – 26 noviembre Dieta adaptación	27 noviembre – 24 abril 2015 Dieta terminación
21 marzo vacuna antiaftosa	21 octubre vacuna antiaftosa		4 marzo vacuna antiaftosa
24 marzo castración			
25 marzo mueren 2 animales			6 enero se retira 1 animal (*)

Tabla 28: Eventos de manejo que tienen efectos de estrés sobre los animales, que podrían predisponer la excreción de E. coli. (*) Se retira un animal por no lograr adaptarse a la dieta

Se inmunizó a los animales contra fiebre aftosa en tres oportunidades, en marzo, octubre de 2014 y en marzo de 2015.

Como consecuencia de las lesiones producidas por la castración quirúrgica, el día 15 de abril de 2014, se producen las muertes de los terneros caravanas N° 750 y 795.

Como resultado de la falta de adaptación a la dieta suministrada, durante el periodo de terminación, el día 12 de enero de 2015, se retira del ensayo al novillo caravana N° 709.

Por lo anteriormente descrito, el ensayo finaliza con 117 animales.

6.12.1- Relación entre las condiciones de manejo y la excreción de STEC

Se buscó relacionar si las diferentes medidas de manejo, a las que fueron sometidos los animales durante el periodo de engorde, pudieron haber actuado como causas predisponentes para la excreción de STEC.

El resultado de los análisis de la influencia de la castración y las inmunizaciones contra la fiebre aftosa, sobre la excreción de STEC, revela que estos están confundidos con las variables climáticas de lluvia y temperaturas. Determinar su relación requiere de un ensayo que contemple mantener las variables ambientales constantes, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio.

6.12.2.- Relación entre las condiciones de manejo y la presencia de Stx

Se indagó sobre la posible relación de las medidas de manejo a los que fueron sometidos los animales, durante el periodo de engorde, pudo haber actuado como factores predisponentes para la manifestación de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

El resultado de los análisis sobre la influencia de los factores de manejo, sobre la presencia de los genes que codifican la expresión de las Shiga toxinas, revela que estos también están confundidos con otras variables climáticas; por lo que para determinar su relación se requiere de un ensayo que contemple mantener las variables climáticas constantes, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio.

6.13.- Resultado del análisis del esponjado de las medias reses en la cámara de oreo

En la cámara de oreo se tomaron muestras de las carcasas de los 117 animales enviados a faena, en la zona perianal, glúteo, cuello, flanco, pecho y zona de corte del raquis de la media res.

En total se tomaron 706 muestras, las que fueron cultivadas en caldo de enriquecimiento, para hacer el cultivo selectivo posterior en Agar Mac Conkey Sorbitol + cefixima telurito + suplemento MUG.

El resultado de todas las pruebas diagnósticas efectuadas en el laboratorio fueron negativas a la presencia de E. coli O157:H7.

6.14.- Dificultades presupuestarias para la ejecución del protocolo experimental previsto

Durante el desarrollo de las actividades previstas en el protocolo experimental, se presentaron contratiempos inesperados. Como consecuencia de la situación económica de la Argentina, imprevistamente, durante los meses de agosto y setiembre de 2014; febrero y marzo de 2015, no fue posible contar con los insumos necesarios para la realización de las pruebas diagnósticas en tiempo y forma, habida cuenta de las demoras en su importación y posterior liberación aduanera.

Capítulo 7: Discusión de resultados

7.1.- Prevalencia de STEC

Los reportes de Parma, A. E., 2000 y Vilte, D. A., 2008, indican que los novillos jóvenes de la principal zona productora de carne vacuna de la Argentina, son un importante reservorio de STEC O157:H7 [35]. Si bien se han identificado otros serogrupos vinculados con la ocurrencia del SUH, este trabajo se ha centrado en la identificación y seguimiento de este serotipo.

Los análisis de los HMRA realizados mensualmente a los 120 animales involucrados en este ensayo de tesis, determinaron un nivel variable de animales excretores de E. coli O157:H7 durante todo el periodo de recría, pastoreo a campo y terminación, previo al envío de los animales al frigorífico. De los 73 animales excretores, 60 (82,19 %) fueron identificados como excretores de STEC en una sola oportunidad y solamente 12 (16,44 %) excretaron 2 veces. Únicamente 1 animal (1,37 %) fue reportado excretando STEC en 3 oportunidades, 2 de las cuales en forma consecutiva. Por otro lado, del total de 1200 muestras, 73 (6,08 %) fueron positivas a STEC O157:H7 durante el periodo de estudio.

Besser, T. et al, 1997, realizaron muestreos mensuales y secuenciales en 10 tambos del estado de Washington, durante 1 año, determinando una considerable variabilidad en la excreción de STEC O157:H7. De los 56 animales positivos (5,13%) sobre 1091 muestreados, 35 (3,20%) excretaron una única vez, 12 (1,09%) repitieron la excreción en 2 oportunidades, de los cuales, 11 en forma consecutiva. Siete vacas (0,64%) excretaron en 3 oportunidades, 1 vaca (0,09%) excretó STEC 4 veces y 1 animal (0,09%) eliminó STEC en 5 oportunidades, estos últimos con resultados positivos intercalados entre resultados negativos. Detectaron que en algunos tambos, la frecuencia de la excreción de STEC era relativamente alta en contraposición con otros, en los cuales no se aisló STEC. No obstante, determinaron que la condición de los tambos con baja prevalencia de STEC durante un periodo prolongado de tiempo, podía cambiar repentinamente.

Por otro lado, Sargeant, J. M. et al, 2000, en un trabajo realizado en 10 establecimientos con un sistema pastoril de cría, en Kansas, EEUU, muestrearon mensualmente, desde diciembre de 1996 hasta diciembre de 1997, tomando muestras de materia fecal inmediatamente después de producidas las deyecciones de las vacas y los terneros.

Durante ese periodo, cada animal fue muestreado de 1 a 8 veces, encontrando una prevalencia del 1,3% (40/3152 muestras). Concluyeron, que la baja prevalencia de STEC O157:H7 encontrada, comparada con otros trabajos, obedece a los métodos de muestreo, medios de cultivo, métodos de diagnóstico empleados y a diferencias geográficas. Observaron que a mayor número de muestras por animal, aumenta significativamente la posibilidad de encontrar mayor cantidad de reaccionantes positivos. No obstante, ningún animal excretó STEC en más de una oportunidad. De los 23 animales identificados como excretores, 11 dieron resultados positivos en el primer muestreo. No encontraron diferencias significativas en los resultados de los muestreos entre la primavera y el invierno siguiente. Concluyeron que la probabilidad que un animal positivo en un muestreo en este estudio, volviera a excretar un mes más tarde, es relativamente baja.

Estudios realizados en España, indicaron que el 95% de las granjas examinadas estaban contaminadas con STEC. Dentro de este análisis, se determinó que el 37% de los terneros y el 27% de las vacas dieron resultados positivos [7,31,32].

Los resultados del trabajo de esta tesis, indican que la prevalencia de STEC O157:H7 en los terneros, al inicio del ensayo, fue del 10,83%, quienes, al alcanzar la categoría de novillitos, promediando el ensayo, presentaron una prevalencia del 15,25%, mientras que al finalizar el periodo de engorde, previo al envío de los novillos al frigorífico, la prevalencia fue de 5,8 %. Por otra parte, los resultados de este ensayo coinciden con los trabajos por Sargeant, J. M., quien informa de la baja probabilidad en que un animal positivo en un muestreo vuelva excretar al mes siguiente.

En un muestreo realizado sobre 811 animales, en nueve frigoríficos de Argentina, (Del Castillo, L., 2014) se tomaron muestras de MF de 373 novillos, 198 vacas, 136 novillitos, 57 vaquillonas y 47 terneros, previo a la faena, para estimar la prevalencia de la E. coli O157. Se determinó una prevalencia de STEC en los terneros del 10,5 %, en las vaquillonas del 8,5%, mientras que para los novillitos fue del 5,1%, en novillos del fue 3,5% y 1,5 % en las vacas. Como puede apreciarse, los resultados de este trabajo son similares a los encontrados por esta tesis en las categorías de terneros y novillos.

La prevalencia de STEC resultante de los HMRA efectuados a los novillitos del ensayo de esta tesis, fue del 15,25%, cifra que es mayor a la encontrada por otros autores. Es por ello importante destacar que en este caso, los terneros alcanzaron la categoría de

novillitos en la primavera de 2014, en donde, los factores climáticos influyeron significativamente sobre la excreción de STEC.

En el Reino Unido, Smith R.P. et al, 2009, hizo un seguimiento en 10 granjas, durante 11 meses, de marzo de 2000 a febrero de 2001, a un promedio de 90 animales por establecimiento, menores de 24 meses, tomando muestras mensuales de la MRA. En esta tesis se efectuó un seguimiento de los animales de un solo rodeo, compuesto, al inicio por terneros, los cuales fueron cambiando de categoría, hasta alcanzar la condición de novillos. Comparten edades y categorías semejantes, durante un lapso de tiempo parecido, comprendiendo las mismas estaciones del año, utilizando los mismos métodos de diagnóstico. Smith aisló STEC O157 en el 7,7% de 6266 muestras, con una variación del 0,4 al 17,9%, mientras que los resultados del presente ensayo arrojaron datos similares, en el cual se observó una prevalencia del 6,08 % sobre el análisis de 1200 muestras. Smith detectó la presencia de 361 animales (26,1 %) excretando STEC O157 sobre 1383 muestreados, con una variación del 1,9 al 48,5 % entre las distintas granjas analizadas. En cambio, en el presente ensayo se detectó, durante un periodo de tiempo similar, un mayor número de animales excretando STEC, 73 (61,86 %) sobre 118. Un total de 269 animales (19,45%) analizados por Smith, resultaron positivos a STEC una sola vez y en el presente ensayo se detectaron 60 animales (50,84 %) excretando STEC O157:H7 en una sola oportunidad. Smith reportó 67 animales (4,84%) excretando STEC dos veces, mientras que el presente trabajo se informa la presencia de 12 animales (10,16%) excretadores. Smith informó que 22 animales (1,59 %) excretaron STEC 3 veces, mientras que el presente trabajo se identificó solamente 1 animal (0,84%) excretando la misma cantidad de veces. El trabajo de Smith informó de la presencia de 3 animales (0,21 %) excretando STEC en 4 oportunidades, mientras que el presente trabajo no se identificaron animales excretando en más de 3 oportunidades. Por otra parte, Smith encontró, en muestras de novillos analizadas, una relativamente baja probabilidad que un animal positivo en un muestreo, volviera a excretar un mes más tarde; e informó que la excreción de E. coli O157:H7 en los animales de su ensayo fue un evento relativamente transitorio, con una duración de 1 mes. Lo mismo se observó en el presente ensayo.

Estos resultados ponen de manifiesto la variación de los patrones individuales de excreción, la proporción de animales excretadores dentro de los rodeos y el tiempo de excreción dentro de los mismos.

Los resultados del estudio de Laegreid, W. W. et al, 1999, diseñado para determinar la prevalencia de E. coli O157:H7 en terneros al destete, antes de su llegada a los corrales de engorde, indicaron que el 83% de los mismos estaban excretando STEC y que en el 100% de los rodeos analizados, los terneros estaban expuestos a STEC al momento del destete.

Sanderson, M. W. et al, 2006, reporta en un estudio longitudinal, sobre la distribución de E. coli O157 en un feedlot con capacidad para 2000 animales, distribuidos en 25 corrales, que la prevalencia en los terneros, dos semanas antes de ingresar a las instalaciones, era del 0,7% (2/273) y se mantuvo baja hasta la quinta semana, donde registró una prevalencia del 36,7% (88/240). Concluyó que las cepas introducidas por los animales al ingresar a los corrales, terminan contaminando y prevaleciendo en el medio ambiente, contagiando a otros animales. Estos resultados se contraponen a los encontrados en esta tesis, en donde los animales ingresan a los corrales con una alta prevalencia (10,8%) y va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar una prevalencia de 0,84% en el mes de julio. Lo mismo sucede cuando ingresan nuevamente a los corrales, con una prevalencia del 15,25%, luego del periodo de pastoreo y va disminuyendo, para llegar en el mes de enero a una prevalencia de 0,85%

El estudio longitudinal de LeJeune J. T. et al, 2003, en un feedlot de Canadá con 75000 animales, dispuestos en corrales de a 500, para determinar la excreción de E. coli O157:H7, registró una prevalencia del 7,4% de STEC al destete y el 15% en el primer muestreo, obtenido 7 días después del arribo de los animales a las instalaciones. Halló por otro lado, que en todos los corrales había por lo menos, 1 o más animales positivos.

En el caso de la presente tesis, las instalaciones del feedlot fueron construidas ad hoc y no hubo presencia de animales en los corrales, previo al ingreso de los mismos al ensayo. Inmediatamente después de la incorporación de los terneros a las instalaciones de engorde, se detectaron 13/120 (10,83%) excretando E. coli O157:H7, por lo cual se puede afirmar que las cepas de STEC fueron introducidas por los animales, los que contaminaron el ambiente de las instalaciones, pero a diferencia de otros autores, la prevalencia de STEC fue disminuyendo hasta la salida al campo.

Otro estudio longitudinal sobre Escherichia coli O157:H7 realizado en un feedlot por Terrance, M. et al, 2009, comprobó que 16/319 terneros (5%) destetados en setiembre (otoño), previo a la entrada al feedlot, provenientes de pasturas, fueron positivos a la E. coli, similar a otros reportes y a los datos aportados por el presente trabajo.

7.2.- Eliminación de STEC en bovinos de acuerdo a la estación del año

Ekong, P. S., et al, 2015, en una revisión sistémica, analizó la prevalencia y la concentración de E. coli O157 en diferentes categorías de animales y en diferentes estaciones del año, informando que la prevalencia estival de STEC era de 10,68% en animales jóvenes, 4,65% en bovinos adultos y 1,79% en vacas lecheras. Por otra parte, reportó que la prevalencia de STEC en invierno era del 9,17% para los animales jóvenes y para los vacunos adultos fue de 4,21%, mientras que en vacas lecheras la prevalencia fue del 0,36%.

En un estudio longitudinal sobre Escherichia coli O157 realizado por Schouten, J. M. et al, 2005, sobre 2164 muestras y 1252 animales muestreados (830 vacas y 422 terneros) en tambos de Holanda, determinó que la excreción de E. coli O157:H7 fue intermitente en los animales infectados, con mayor prevalencia en otoño en vacas adultas y menor prevalencia en invierno.

Smith R.P. et al 2009, realizando un estudio longitudinal en Gran Bretaña sobre la excreción de STEC en bovinos de carne jóvenes, informó que los picos de prevalencia de STEC O157, en algunos rodeos, ocurrieron durante la primavera y en otros en el verano. Destacó que los patrones estacionales de excreción no guardaban relación con reportes de otros países europeos.

Besser, T. et al 1997, encontraron, en un estudio realizado en vacas lecheras, en el estado de Washington, una variación estacional en la excreción de E. coli O157:H7, reportando índices de excreción elevados durante el verano y el otoño, separados por períodos de baja excreción durante el invierno y la primavera.

Coincidentemente, Fernandez, D. y Padola, N. 2012, observaron en Argentina una mayor prevalencia de STEC en terneros de tambo en épocas cálidas.

A su vez, se ha reportado en Alberta, Canadá, por Van Donkersgoed, J. et al, 2001, que los factores estacionales que inciden en la excreción de STEC, registran una prevalencia mayor durante los meses de verano y otoño, siendo menores en los meses de invierno, estación donde se detecta una baja o nula excreción de STEC.

Respecto a la influencia estacional como factor predisponente para la excreción de STEC O157:H7, la revisión bibliográfica indica que existen picos de prevalencia

estacionales en verano, como consecuencia de la mayor cantidad de horas luz diurna, lo que favorecería la capacidad de multiplicación de la bacteria en los animales, ayudando a la sobrevivencia del agente patógeno en el ambiente; y por ende, colaborando en la transmisión.

Coincidentemente, durante los meses cálidos, se registra la mayor cantidad de brotes de SUH, (Van Donkersgoed, J. et al, 2001; LeJeune et al, 2004; Kovatset al, 2004; Rangel et al, 2005; Hussein, 2007; Edrington et al, 2006; Lal et al, 2012).

Por otro lado, en Escocia, un reporte de Chase-Topping, M. et al, 2008, indica que la prevalencia de STEC en bovinos de carne fue más elevada en invierno (20%), mientras que en el verano fue del 8,7%.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las prevalencias de STEC bajan durante el otoño, ascienden en la primavera y disminuyen durante el verano. Si bien se observan prevalencias dispares entre este trabajo de tesis y los reportes de distintos autores de diferentes países, se considera que, para efectuar comparaciones respecto al comportamiento estacional de la prevalencia, es necesario tener en cuenta las características climáticas de cada país. Teniendo en cuenta las disímiles condiciones meteorológicas de cada región, como así también los sistemas de producción, fundamentalmente intensivos y en estabulación en Europa, predominancia de feedlots en Estados Unidos y en Canadá y mayoritariamente extensivos en la Argentina. Situación que hace difícil comparar resultados entre trabajos generados bajo diferentes condiciones. En este sentido, Fernández, D. et al, 2009, recomienda ser cuidadosos a la hora de hacer comparaciones con la prevalencia de STEC registrada en otros países e incluso dentro de un mismo país, ya que se pueden observar variaciones debidas a múltiples factores, como el número y la categoría de animales muestreados, el método de muestreo, metodología empleada para el procesamiento de las muestras, la estación del año, factores climáticos – ambientales, nutricionales y de manejo, en la que los estudios fueron realizados.

También, es importante destacar que este trabajo de tesis se realizó sobre animales provenientes de un rodeo cerrado, a los que se les hizo un seguimiento a lo largo de un año, durante el cual, los mismos fueron cambiando de categoría, desde su ingreso en otoño, como terneros, pasando a la categoría de novillitos en primavera, hasta alcanzar la categoría de novillos en el otoño siguiente. Si bien se trató de los mismos animales,

las prevalencias registradas durante el periodo de estudio obedecieron a distintas categorías.

Esta situación, planteada en este trabajo de tesis, simula de alguna manera, lo que ocurre con la dinámica productiva y comercial del sector pecuario Argentino, en el cual, diferentes categorías de animales, dependiendo del periodo del año, de las condiciones climáticas, de las necesidades financieras de las empresas, entran y salen de planteos pastoriles hacia encierres a corral y viceversa.

7.3.- Presencia de los factores de los factores de virulencia Shiga

Etcheverria, A. et al, 2013, en un estudio longitudinal en Tandil, Argentina, sobre el rol del bovino adulto, como reservorio de STEC portadores de los genes de los factores de virulencia para las Stx, reportaron la prevalencia del gen para la Stx2 en 51 de las 86 cepas aisladas (59,3%). Solamente el 7% de las STEC llevaban el gen **eae**. Únicamente en 4 de las 86 STEC aisladas, se encontró que portaban los genes para la expresión de los factores de virulencia para Stx y **eae**.

En un seguimiento de 14 establecimientos de la región Pampeana, realizado por Parma et al., 2000, durante 3 años, se realizaron HMRA sobre 244 bovinos de carne en pastoreo, pertenecientes a un mismo rodeo, determinando que la presencia del gen **eae** de la región constante de Intimina se manifestó con mayor frecuencia en terneros (20/26) que en bovinos adultos (1/39). Se concluye que algunas de las cepas aisladas en terneros y la mayoría de las cepas aisladas en adultos, no correspondían al serotipo O157:H7.

Blanco, M. et al, 2000, comunicaron que el gen **eae** y el gen Stx2, para el serotipo de la E. coli O157:H7, fueron los hallazgos más comunes, seguidos de los genes **eae** y Stx1, y a su vez la presencia del gen **eae** fue significativamente mayor entre cepas portadoras del gen Stx1, aisladas en terneros y el gen para Stx2 predominó en los aislamientos de STEC de los animales de mayor edad. En el presente trabajo, utilizando SIM y la prueba de aglutinación de látex para la captura de E. coli O157:H7, se encontró que el 100% de las cepas aisladas de los animales identificados como excretores, portaban el gen **eae** de la región constante de Intimina y el gen **rfbO₁₅₇**, responsable de la síntesis del antígeno somático O [32].

En la Argentina, Padola, N. et al, 2010, informaron prevalencias del 20% para la presencia del gen Stx2, 9% para el gen Stx1 y 4% para la presencia conjunta de Stx1 y Stx2, sobre 126 terneros y 118 vacas lecheras muestreados, indicando que los hallazgos del gen Stx2, son más comunes en animales de mayor edad [32,125].

Estudios ya citados de Blanco, M. et al, 2010, de España, indican que la prevalencia de los genes que codifican la expresión de la Stx2 y Stx1 - Stx2, portados por STEC O157:H7, resultaron proporcionalmente similares, tanto para vacas como para terneros. En contraste, el hallazgo de los genes para Stx1 fue más común en terneros. También, en trabajos del mismo autor, se ha reportado que, sobre 514 aislamientos de bovinos con y sin diarrea, el 20% de las STEC eran portadoras del gen Stx1; el 54% portaban el gen para Stx2 y el 26% portaban ambos genes Stx1 y Stx2 [32].

LeJeune J. T. et al, 2003, en un feedlot de 75000 animales en Canadá, identificaron los genes para la codificación conjunta de Stx1 y Stx2 en el 83% de las muestras, los genes para Stx2 en el 16% y el 0,43% para los genes de Stx1.

En un seguimiento del comportamiento de la STEC en tambos, realizado en Argentina por Fernández, D. y Padola, N., 2012, analizaron la presencia de las diferentes Stx en cada estación del año, en vacas de tambo, reportando un aumento de las cepas portadoras de los genes Stx1 - Stx2 y una disminución de las Stx1 en estaciones cálidas, manteniéndose estable la presencia cepas portadoras del gen Stx2 en todas las estaciones del año.

Los resultados de los análisis realizados en la presente tesis determinaron, que la presencia de los genes que codifican la expresión de la Stx1 se verificó solamente en animales jóvenes (11%), al inicio del ensayo, durante un breve periodo de tiempo. En cuanto a los genes que codifican la expresión de la Stx2 se detectaron en el 33% de las muestras, manifestándose en forma constante a lo largo de todo el ensayo, con poca variación. La expresión de los genes que codifican en forma conjunta a la Stx1 y Stx2 (56%) fue irregular a lo largo del periodo del estudio, destacándose, durante la primavera, su presencia en un elevado número de muestras.

7.4.- Relación de los factores climáticos con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga

En este trabajo de tesis, cuando se confrontaron estadísticamente, la influencia de los factores climáticos (precipitaciones y temperaturas) con la excreción de STEC, se determinó que hay una relación positiva significativa entre la lluvia y las temperaturas mínima y media con la excreción de E. coli O157:H7. Con respecto a los factores de virulencia de las STEC, no se encontró relación entre la lluvia y las temperaturas con la presencia de los genes que codifican la expresión de las Stx1 y Stx2. Por el contrario, estos factores climáticos influyeron significativamente sobre la expresión conjunta de la Stx1 y Stx2. Destacándose que durante el año 2014 ocurrieron precipitaciones por encima de la media histórica, registrándose valores elevados durante la primavera. Se encontró que la presencia de los genes que codifican a la Stx2 se expresaron en forma regular a lo largo de todo el periodo del ensayo, sin sufrir la influencia de los factores meteorológicos, situación que amerita tenerse en cuenta, dada la toxicidad de esta Stx y su incidencia en la patogenia del SUH en la Argentina.

Varios autores hacen referencias y concuerdan en que las estaciones del año influyen sobre la excreción de STEC. En general citan una mayor prevalencia en las épocas cálidas y lluviosas (primavera-verano) y menor en invierno. Sin embargo, en ninguno de los trabajos publicados se correlacionan los registros de temperatura y precipitaciones con la excreción de E. coli O157:H7.

7.5.- Relación de los factores ambientales y de manejo con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga

Respecto a la incidencia de los factores ambientales, como causa predisponente para la excreción de STEC O157:H7, Smith, D. R. et al 2005 y Sanderson, M. W. et al, 2006, citan que las condiciones de los corrales de engorde, con gran cantidad de barro y exceso de humedad, como las condiciones secas y polvorientas, pueden impactar como factor predisponente para la excreción y la transmisión de E. coli O157:H7 y mantener alta la prevalencia de STEC en los animales.

Le Jeune, J. T. et al, 2004, informó, en un estudio longitudinal de excreción de E. coli O157:H7, realizado en feedlots del estado de Ohio, USA, que la excreción de STEC fue de corta duración. Concluyó que los episodios de reinfección dentro del rodeo pueden

obedecer a factores ambientales o alimentarios, los que disminuyen la resistencia transitoria de los animales a la colonización de STEC. Por lo que la identificación y la eliminación de estos factores podrían disminuir sustancialmente la exposición del hombre a este agente infeccioso.

Van Donkersgoed, J. et al, 2001, Padola, N. et al, 2004, Berg, J. et al, 2006, mencionan el transporte de los terneros, los cambios de dieta, vacunaciones, manejo de los animales dentro de las instalaciones y otras causas de estrés, incluidas las condiciones de los corrales, como factores que favorecerían la predisposición de los animales a la excreción de STEC.

Kuduva, I. T. et al, 1996, informa que si bien, los factores que desencadenan el inicio de la excreción de STEC en los terneros que ingresan al feedlot, no están bien determinados, afirma que el estrés nutricional juega un papel predisponente para la excreción, contaminación del ambiente y el posterior contagio de otros animales.

En el trabajo de Fernández, D. y Padola N., 2012, donde analizaron el comportamiento de la STEC en tambos, indicaron que la alta prevalencia de STEC en terneros pudo deberse a una mejor colonización del TGI, favorecido por el estrés pos destete, por un menor desarrollo del sistema inmunológico, cambios en la dieta o a cambios anatómicos y fisiológicos del TGI.

En el presente trabajo, el resultado de los análisis sobre la posible influencia de los factores de manejo, como la castración y las inmunizaciones contra la fiebre aftosa, sobre la excreción de STEC y la presencia de los genes que codifican la expresión de las Shiga toxinas, revelaron que estos están confundidos con otras variables. Determinar su relación requiere de un ensayo que contemple mantener estas variables ambientales constantes, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio.

7.6.- Relación del peso y las características de la alimentación con la excreción de STEC y la presencia de los factores de virulencia Shiga

En un estudio longitudinal realizado en Canadá por LeJeune J. T. et al, 2003, informó que el incremento de la concentración de grano en la dieta, que fue en aumento durante el primer mes de encierre, pudo contribuir a acrecentar la susceptibilidad de los animales

a la infección y a incrementar la excreción de E coli O157:H7 durante los primeras 4 semanas de encierre. Cuando la concentración de grano de la dieta se estabilizó, notó que también la prevalencia de excreción de STEC se estabilizó en un nivel bajo. También informó que la edad y el peso de los animales fue un factor predisponente sobre la excreción de STEC. Los animales jóvenes excretaron más que los animales adultos, estableciéndose que los animales con pesos inferiores a los 317 kg mostraron mayor índice de excreción.

Berg, J.; et al, 2004, en un trabajo realizado para comparar el comportamiento de la excreción de E. coli O157:H7 en novillos encerrados en 15 corrales (300 a 500 por corral) alimentados con una ración de terminación a base de grano de cebada y en otros 15 corrales con animales alimentados con una dieta en base a grano de maíz, determinó que la prevalencia de excreción fue del 2,4% en el ganado alimentado con cebada y el 1,3% en el ganado alimentado con maíz. Informó que la diferencia entre los novillos alimentados con cebada y los alimentados con maíz pudo estar dada por el Ph de la materia fecal, que en el caso de la dieta a base de maíz era más bajo.

Cernicchiaro, N. et. al., 2010, evaluó los efectos del contenido de humedad de la fuente de energía (maíz húmedo y maíz entero seco) con la utilización de dos núcleos, sobre la excreción de E. coli O157: H7 en 168 novillos Angus cruza, encerrados en 24 corrales. Los animales alimentados con maíz entero presentaron una prevalencia mayor que los animales alimentados con maíz húmedo. Sin embargo, informó que el efecto del tipo de maíz en la prevalencia de E. coli O157:H7 varía con el tipo de aditivo para piensos utilizados.

En este trabajo de tesis, con respecto a la distribución de los terneros en los corrales, de acuerdo a los pesos (livianos y pesados) y al nivel de PB de las dietas a los que fueron sometidos, se determinó que el nivel de suplementación proteica, tanto en livianos como en pesados, no influyó sobre la excreción de STEC.

Pero, cuando se analizó individualmente a la dieta de recría que contenía el 9% de PB, se destaca que la presencia conjunta de Stx1 y Stx2 tiene valores más elevados que los que consumen la dieta con 13% y con 18% de PB.

Al analizar a los animales livianos y pesados al inicio del ensayo, se observó en los livianos, un aumento de excreción de STEC durante el periodo de terminación.

Jacob, M. et. al. 2009, reportó que la composición de la dieta tiene incidencia en la excreción y prevalencia de la E. coli O157:H7 en los bovinos, pero que los mecanismos específicos responsables del aumento o disminución de la excreción no se conocen muy bien, sosteniendo que pueden deberse a los cambios en la bioecología del intestino grueso, inducida por los tipos de dieta. Con respecto a esta afirmación, concluyó que los resultados de los estudios, son muchas veces contradictorios o no repetibles, como consecuencia de la complejidad del ecosistema del intestino de los animales, de los efectos de la variada gama de materias prima que se usan en la alimentación y la variedad de ingredientes que se utilizan para la formulación de dichas dietas.

Los reportes (Meichtri et al, 2004) sobre los análisis realizados en un matadero en la Argentina, entre julio de 1999 y diciembre de 2000, detectaron, sobre 70 muestras de MF y 130 HMRA de novillos de 14 a 16 meses de edad, alimentados con una dieta en base a granos, durante 3 a 4 meses previo a la faena, la presencia de STEC en el 39% de los animales [63].

Mercado, E., 2006 en un trabajo sobre el control de la excreción de la STEC en el ganado bovino de carne, informa que cuando se pasó abruptamente de una dieta basada en grano de maíz a forraje, se observó una disminución de animales excretando E. coli O157:H7. En el trabajo de esta tesis se observó, al contrario de lo antecitado, que cuando los animales alimentados con la dieta de recría, basada en granos, pasaron a pastoreo a campo, la cantidad de animales excretando STEC aumentó, no coincidiendo con lo reportado por otros autores [64,65,66,67,73,74,104]

7.7.- Discusión de las hipótesis

Los estudios ya citados [7,31,32], indican que la prevalencia de la citototoxina Stx1 fue mayormente aislada en terneros de entre 4 y 8 meses de edad, hecho que se confirma con los resultados de los HMRA de los meses de marzo, abril y mayo.

Por otro lado, los informes de la Argentina, respecto a la presencia de las Stx2 y Stx1 - Stx2, para el serotipo de la O157:H7, indican que sus hallazgos son más comunes en animales de mayor edad [32].

Acorde a la evaluación de los resultados del ensayo y al análisis de los datos obtenidos, se determinó que:

7.7.1.- Discusión Hipótesis 1

Durante el desarrollo del ensayo, las pruebas diagnósticas revelaron la existencia de animales excretores de STEC, desde el inicio del encierre, hasta el último muestreo, previo al envío de los animales al frigorífico. Determinándose a su vez, un número variable de animales excretando E. coli O157:H7 a lo largo de todo el ensayo. Si consideramos a los animales que se detectaron como eliminadores de SETEC en los distintos muestreos, encontramos un escaso contagio dentro de un mismo corral. Pero sí se detectaron animales excretores en distintos corrales, a lo largo del periodo de estudio, siendo difícil establecer las posibles vías de contagio. Sin embargo, es evidente que la aparición de animales positivos en corrales distantes, implicaría la presencia de portadores que no son eliminadores, los que bajo determinadas circunstancias se convertirían en excretores de STEC.

Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos, la suposición inicial que sostiene que la detección temprana de animales excretores al inicio del encierre, permitiría reducir, al finalizar el ciclo de engorde, la presencia de STEC en los animales destinados a faena, es poco probable.

7.7.2.- Discusión Hipótesis 2

Si bien se detectó la presencia de animales excretando, temporalmente, E. coli O157:H7 en más de una oportunidad, esta condición no permite inferir que los mismos sean excretores persistentes.

En consecuencia, de acuerdo a los antecedentes y a los resultados obtenidos, se puede inferir que, una vez presente el agente etiológico en los corrales, el mantenimiento de su prevalencia no está supeditada a la presencia de animales que excretan E. coli en forma continua, por lo que se refuta la formulación de la segunda hipótesis.

7.7.3.- Discusión Hipótesis 3

Estadísticamente se determinó que la influencia de las lluvias y las temperaturas inciden sobre la excreción de STEC, indicando que cuando estas aumentan, también lo hace su excreción.

El resultado de los análisis de la influencia de las diferentes medidas de manejo, sobre la excreción de STEC, revela que estas están confundidas con las variables climáticas de lluvia y temperatura. Determinar su relación requiere de un ensayo que contemple mantener las variables climáticas constantes, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio.

El análisis en relación a los pesos, determinó en los animales livianos, un aumento de excreción de STEC en el periodo de terminación, mientras que los animales pesados no presentan diferencias en la excreción durante el mismo periodo.

Con respecto a los factores nutricionales, se determinó que las diferentes dietas influyeron en la excreción y presencia de factores de virulencia.

Se acepta que los factores como el clima, el peso y factores nutricionales, pueden incrementar la excreción de STEC. Por el contrario, por lo expresado anteriormente, no fue posible establecer una correlación entre el manejo y la excreción de STEC.

7.7.4.- Discusión Hipótesis 4

De los resultados del análisis comparativo entre el periodo de recría versus pastoreo a campo y terminación se desprenden diferencias significativas, debido a que la Stx1 aparece solamente durante el periodo de recría y luego desaparece. La Stx12 es más frecuente durante las dos últimas etapas. Cuando se analizan las etapas de campo y terminación, se destaca que la presencia conjunta de las Stx1 Y Stx2 se manifiesta significativamente más durante la etapa de pastoreo a campo, en tanto que la Stx2 se manifiesta más durante la etapa de terminación, pero su comportamiento, en general, se mantiene presente en los tres períodos de alimentación.

Los factores de virulencia Stx1, Stx2 y Stx12 presentes en las STEC excretados por los animales durante el ciclo de engorde, tuvieron comportamientos diferentes, aceptándose la hipótesis propuesta.

7.8.- Discusión sobre los aspectos de la influencia de las dificultades económicas para conseguir los insumos de laboratorio en los resultados de los ensayos.

La imposibilidad de procesar los HMRA y los posteriores aislamientos de STEC, en los meses de agosto y octubre de 2014, impidió contar con los datos sobre el comportamiento de la excreción de STEC en los animales, durante ese lapso de tiempo. Especialmente en el momento del ensayo, durante el cual, la excreción de STEC coincidió con un aumento de las precipitaciones y las temperaturas. En otro momento, el verano de 2015, se generó otro bache, en el cual, coincidentemente con la incidencia de las altas temperaturas, no se pudo tener información sobre la excreción de STEC. De haber contado con los resultados de esos muestreos, se hubiera podido hacer un mejor análisis, permitiendo contar con la secuencia mensual completa de la excreción de STEC y la identificación de sus factores de virulencia.

Capítulo 8: Conclusiones

Se asocia esta tesis con la falta de inocuidad y de seguridad alimentaria en la carne bovina, cuando el factor de riesgo de contaminación radica en la presencia de animales excretores de *E. coli* O157:H7, durante el periodo de recría, pastoreo a campo y terminación, hasta el momento de la faena; y desde el frigorífico, cuando la misma pasa a la cadena comercial y de ahí a los consumidores.

El análisis de los datos aportados por este trabajo, determinaron que la *E. coli* O157:H7 es introducida por los terneros que ingresan a los corrales de engorde, después del destete, revelando la existencia de animales excretores desde el inicio del encierre hasta el final, confiriéndole así a la STEC la condición de endémica dentro de las instalaciones.

Si bien, se detectaron animales excretando temporalmente *E. coli* O157:H7, en más de una oportunidad, a lo largo de todo el periodo de ensayo, esta condición no permitió inferir que los mismos sean excretores persistentes.

Si en los corrales hubiese habido animales excretores persistentes, estos no fueron detectados. Independientemente a esto, no se observó en el grupo en estudio, un contagio importante entre animales de un mismo corral e incluso, que hubiera contagio entre animales de corrales linderos.

Por otro lado, se vio que el nivel de contagio en el campo fue superior que el registrado en los corrales.

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto la variación de los patrones individuales de excreción, la proporción de animales excretores dentro de las instalaciones, y el tiempo de excreción.

Se observó que la excreción de STEC varía a lo largo del año, con niveles de excreción altos al inicio del ensayo, luego disminuyen gradualmente hacia el mes de julio, presentando niveles más elevados en setiembre y noviembre, coincidiendo con el pastoreo a campo, volviendo a disminuir progresivamente a partir del reingreso de los animales a los corrales (noviembre). Al finalizar el ensayo, se observa un leve incremento de la excreción (abril) previo al envío al frigorífico.

Contradictoriamente a lo citado en la bibliografía, se observó en este trabajo que un número mayor de animales excretó *E. coli* O157:H7 cuando se cambió la dieta basada en granos por el pastoreo a campo.

Al analizar el comportamiento de los animales livianos y pesados al inicio del periodo de engorde, se observó en los livianos, un aumento de excreción de STEC durante el periodo de terminación. Situación a tener en cuenta al momento del ingreso de animales a los corrales, ya que se esperaría una mayor excreción, en aquellos que ingresan con bajo peso a la recría. Por lo tanto, la observación de la condición corporal, al inicio la recría, permitiría alertar a las plantas frigoríficas, al momento de su envío a faena, con el objeto de que extremen las medidas de control.

Si bien se comprobó que las temperaturas y las precipitaciones actuaron como factores predisponentes para la excreción de *E. coli* O157:H7, sin embargo, podemos afirmar, que la excreción se mantuvo a lo largo del ensayo.

La portación de genes Stx es variable. El gen Stx1 se detectó en terneros jóvenes y no se vuelve expresar en los HMRA posteriores. La presencia de Stx2 se mantuvo constante durante el periodo de estudio; dato importante, ya que este factor de toxicidad está asociado con la patogenia del SUH, habida cuenta que esta variante es la responsable del mayor número de causas de muerte en niños que padecen la enfermedad. La portación conjunta de los genes Stx1 y Stx2 es elevada en marzo y significativamente mayor durante el pastoreo de setiembre y noviembre.

Se determinó que las temperaturas y las lluvias no influyeron sobre la presencia de los factores de virulencia para la Stx1 y Stx2, mientras que sí incidieron sobre la expresión conjunta de los factores de virulencia para la Stx1 y Stx2.

El análisis sobre la influencia de los factores de estrés, como la castración y las inmunizaciones contra la fiebre aftosa, sobre la excreción de STEC y la presencia de Shiga toxinas, reveló que estos están confundidos con las variables climáticas. Determinar su relación requiere de un ensayo que contemple mantener estas variables reguladas, situación que no se condice con el contexto experimental de este estudio.

Si bien se trabajó con una baja densidad de animales en los corrales, se pudo demostrar que los bovinos se comportan como reservorio, situación que adquiere vital importancia, habida cuenta el alto consumo de carne por habitante en la Argentina.

La ejecución de prácticas tendientes a reducir la colonización del TGI de los bovinos por E. coli O157:H7, aún se encuentran en fase de experimentación, y por otro lado, las medidas tendientes a disminuir la carga de STEC en los productos alimenticios manufacturados, la carne y sus subproductos en este caso, no reducen a cero la probabilidad de contraer la enfermedad en el hombre, por ende, es pertinente seguir analizando propuestas que permitan la implementación de acciones preventivas.

Considerando el nivel de prevalencia encontrado en los novillos, previo a su envío a frigorífico (5,08%), no fue posible identificar E. coli O157:H7 en las carcasas.

Se concluye que con estos niveles de infección y con la implementación de buenas prácticas de faena, las probabilidades de contaminación de la carne son muy bajas.

Es por estas circunstancias que la realización de trabajos transversales y longitudinales que permitan estimar la magnitud y la distribución de la enfermedad por un lado y factores de riesgo por otro, son de importancia para el avanzar en la adopción de medidas preventivas, que contribuyan a disminuir la prevalencia de STEC en el ganado bovino destinado a faena y consecuentemente propender a una reducción del número de casos de SUH.

Capítulo 9: Perspectivas futuras

9.1.- Entre las posibles líneas futuras de investigación, se propone el estudio de la dinámica de excreción, contaminación, infección y persistencia de E. coli O157:H7 a lo largo del tiempo, en sistemas de encierres y pastoreos alternativos no programados, como consecuencia de crisis hídricas y forrajeras y/o decisiones económico-financieras, en la estrategia de gestión de las empresas, que reflejen la realidad de los sistemas productivos existentes.

9.2.- Se plantea la realización de estudios sobre la excreción de la E coli O157:H7 y la presencia de sus factores de toxicidad, en animales en terminación, previo al envío a faena, que ingresaron a la recría con condición corporal regular o mala.

9.3.- Se propone realizar un seguimiento de animales que excretaron en más de una oportunidad, cepas portando los mismos factores de toxicidad, para determinar si son los mismos genotipos presentes en distintos muestreos, o se produce una reinfección del mismo animal con otro serotipo.

9.4.- Se sugiere el seguimiento de la excreción de STEC O157:H7 en sistemas de engorde a corral y extensivos a campo, en una misma región (con características climáticas similares), para confirmar los patrones de infección entre uno y otro sistema.

9.5.- Se propone la genotipificación de las Stx de las cepas de STEC obtenidas durante el ensayo, mediante la utilización de PFGE o gel electroforesis en campo pulsado (GECP).

9.6.- Se sugiere realizar estudios de patogenicidad y persistencia en bovinos y otros modelos animales, de algunas de las 73 cepas de STEC aisladas, que presenten determinadas características genotípicas.

9.7.- Dada la persistencia encontrada, a lo largo de todo el periodo de estudio, en la eliminación de E. Coli O157:H7 portadoras de la Stx2, sería de interés conocer la dinámica del contagio y los factores de riesgo que se encuentran involucrados específicamente para este serotipo.

Capítulo 10: Anexos



Foto 6: Novillos identificados con caravana numerada en la oreja izquierda y en el pabellón derecho, botón numerado de seguridad y caravana de color indicando el nivel de PB de la dieta a los que fueron sometidos.

En las tablas 29 y 30 se individualiza el comportamiento de los animales que excretaron STEC, con la correspondiente identificación genética de las Stx presentes en cada uno de los corrales, a partir de los HMRA que se realizaron mensualmente, desde el 14 de marzo de 2014 hasta el 7 abril de 2015.

CARAVANA	CORRAL	RESULTADO 19/03/2014	RESULTADO 21/04/2014	RESULTADO 13/05/2014	RESULTADO 10/06/2014	RESULTADO 07/07/2014	RESULTADO 11/08/2014	RESULTADO 10/09/2014	RESULTADO 09/10/2014	RESULTADO 04/11/2014	RESULTADO 09/12/2014	RESULTADO 12/01/2015	RESULTADO 07/04/2015
707	1												
738	1												
811	1									Stx2			
815	1		Stx1										
703	2												Stx2
737	2												
755	2												
803	2				Stx1-2	Stx2							
706	3												
749	3												
798	3												
813	3	Stx2											
588	4												
769	4										Stx2		
774	4	Stx1-2											
814	4												Stx2
596	5												
724	5												
729	5												
770	5									Stx 1-2			
741	6												
777	6				Stx 2								
787	6							Stx 2			Stx 1-2		
806	6												
717	7							Stx 1-2					
745	7												Stx 1-2
786	7												
742	8		Stx 2										
764	8							Stx 2			Stx 2		
781	8												
739	9												
790	9												Stx2
799	9												
715	10	Stx 1											
730	10												
800	10												
771	11										Stx 2		
775	11												
804	11							Stx 1-2					
595	12							Stx 1-2				Stx 1-2	
747	12												
789	12												
763	13							Stx 1-2					
778	13							Stx 1-2					
791	13												
751	14												
762	14												
780	14												
593	15												
711	15												
783	15	Stx 1											
728	16												
792	16									Stx 1-2			
805	16	Stx 1											
721	17									Stx 1-2			Stx 1-2
748	17									Stx 1-2			
767	17							Stx 1-2					
740	18												
784	18												
796	18												

Tabla 29: Se muestran a los resultados de la identificación genética de las Stx, portadas por las STEC excretadas por los animales, distribuidos en los corrales numerados del 1 al 18, durante el ensayo.

589	19												
700	19												
795	19	Stx 1-2											
788	19												
725	20	Stx 1-2											
727	20									Stx 1-2			
750	20												
810	20												
735	21												
772	21												
793	21												
794	21												
732	22												
746	22									Stx 1-2			
753	22	Stx 1-2											
801	22												
716	23					Stx 2							
718	23					Stx 1				Stx 1-2			
768	23												
797	23									Stx 1-2		Stx 1-2	
712	24									Stx 2			
719	24												
744	24											Stx 1-2	
816	24												
743	25					Stx 2							
776	25	Stx 1-2											
713	25											Stx 1-2	
704	26					Stx 2						Stx 2	
709	26											Stx 1-2	RETIRADO
754	26					Stx 2							
733	27												
782	27	Stx 2											
808	27												
702	28												
714	28												
731	28												
736	29									Stx 1-2			
757	29												
758	29									Stx 1-2		Stx 1-2	
766	30												
802	30												
809	30												
759	31												
760	31											Stx 2	
779	31											Stx 1-2	
701	32	Stx 2								Stx 1-2			
708	32												
720	32												
591	33												
773	33					Stx 1						Stx 1-2	
785	33												
592	34												
723	34											Stx 1-2	
765	34	Stx 2	Stx 2							Stx 1-2			
710	35									Stx 1-2		Stx 1-2	
722	35									Stx 1-2		Stx 1-2	
734	35									Stx 1-2			
705	36												
756	36											Stx 1-2	
807	36												Stx 2
812	36	Stx 1											

Tabla 30: Se muestran a los resultados de la identificación genética de las Stx, portadas por las STEC excretadas por los animales, distribuidos en los corrales numerados del 19 al 36, durante el ensayo.

FECHA	CARAVANA	P C R													
		rfb258	eeae 345	Stx2	Stx1	FECHA	rfb258	eeae 345	Stx2	Stx1	FECHA	rfb258	eeae 345	Stx2	Stx1
19/03/2014	805	Pos	Pos	Neg	Pos										
19/03/2014	782	Pos	Pos	Pos	Neg										
19/03/2014	725	Pos	Pos	Pos	Neg										
19/03/2014	715	Pos	Pos	Neg	Pos										
19/03/2014	701	Pos	Pos	Pos	Neg	10/09/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
19/03/2014	774	Pos	Pos	Pos	Pos										
19/03/2014	776	Pos	Pos	Pos	Pos										
19/03/2014	753	Pos	Pos	Pos	Pos										
19/03/2014	812	Pos	Pos	Neg	Pos										
19/03/2014	795	Pos	Pos	Pos	Pos										
19/03/2014	765	Pos	Pos	Pos	Pos	15/04/2014	Pos	Pos	Pos	Neg	10/09/2014	Pos	Pos	Pos	Pos
19/03/2014	813	Pos	Pos	Pos	Neg										
19/03/2014	783	Pos	Pos	Neg	Pos										
15/04/2014	765	Pos	Pos	Pos	Neg										
15/04/2014	815	Pos	Pos	Neg	Pos										
15/04/2014	742	Pos	Pos	Neg	Neg										
15/04/2014	704	Pos	Pos	Pos	Neg	09/12/2014	Pos	Pos	Pos	Neg					
15/04/2014	773	Pos	Pos	Neg	Pos	04/11/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
13/05/2014	718	Pos	Pos	Neg	Pos	10/09/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
13/05/2014	716	Pos	Pos	Pos	Neg										
13/05/2014	754	Pos	Pos	Pos	Neg	07/04/2015	Pos	Pos	Pos	Pos					
13/05/2014	743	Pos	Pos	Pos	Neg										
16/06/2014	777	Pos	Pos	Pos	Neg										
16/06/2014	803	Pos	Pos	Pos	Pos										
07/07/2014	803	Pos	Pos	Pos	Neg										
10/09/2014	595	Pos	Pos	Pos	Pos	12/01/2015	Pos	Pos	Pos	Pos					
10/09/2014	710	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	712	Pos	Pos	Pos	Neg										
10/09/2014	717	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	734	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	736	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	746	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	758	Pos	Pos	Pos	Pos	04/11/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
10/09/2014	763	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	764	Pos	Pos	Pos	Neg	09/12/2014	Pos	Pos	Pos	Neg					
10/09/2014	765	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	767	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	778	Pos	Pos	Pos	Pos										
10/09/2014	787	Pos	Pos	Pos	Neg	09/12/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
10/09/2014	797	Pos	Pos	Pos	Pos	04/11/2014	Pos	Pos	Pos	Pos					
10/09/2014	804	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	773	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	723	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	770	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	779	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	744	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	727	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	811	Pos	Pos	Pos	Neg										
04/11/2014	760	Pos	Pos	Pos	Neg										
04/11/2014	713	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	756	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	722	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	748	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	721	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	792	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	709	Pos	Pos	Pos	Pos										
04/11/2014	710	Pos	Pos	Pos	Pos										
09/12/2014	769	Pos	Pos	Pos	Neg										
09/12/2014	771	Pos	Pos	Pos	Neg										
07/04/2015	721	Pos	Pos	Pos	Pos										
07/04/2015	703	Pos	Pos	Pos	Neg										
07/04/2015	814	Pos	Pos	Pos	Neg										
07/04/2015	745	Pos	Pos	Pos	Pos										
07/04/2015	790	Pos	Pos	Pos	Neg										
07/04/2015	807	Pos	Pos	Pos	Neg										

Tabla 31: Se exponen los animales excretores de STEC y la identificación genética del gen *rfbO157*, responsable de la síntesis del antígeno somático O, el gen *eeae*, que codifica para la proteína intimina y de las Stx, factores de toxicidad responsables de los daños celulares en los distintos órganos del hospedador.

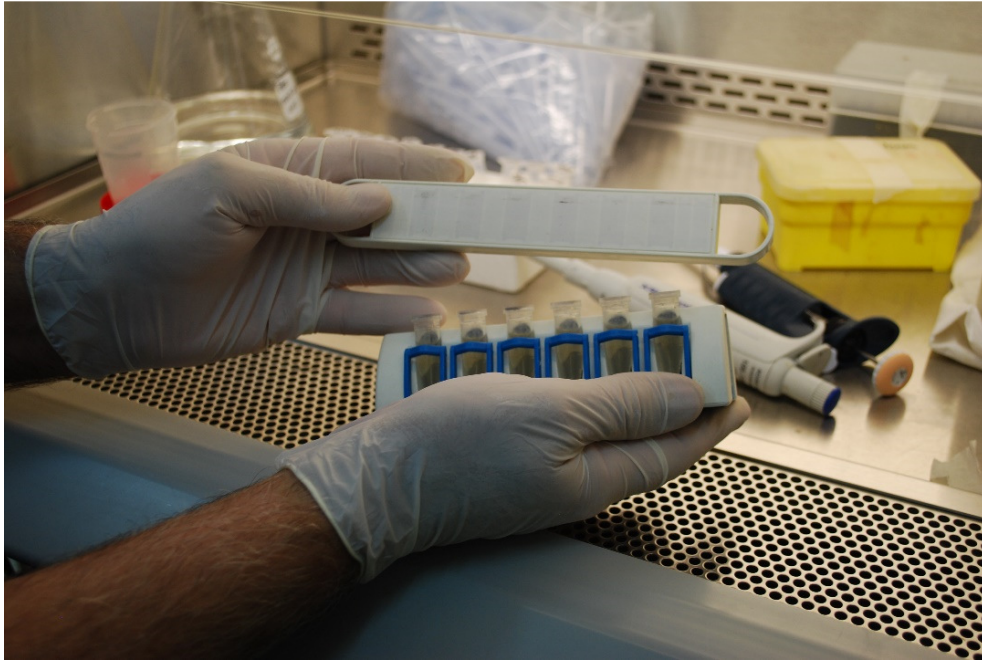


Foto 7: Tubos Eppendorf en la placa concentradora de partículas (PCP) (DynaL - MPC®-S Biotec Magnetic Particle Concentrator for Microcentrifuge Tubes – Pro. N° 120.20), a la que se le agrega en la parte posterior, la placa magnética, durante 5 minutos, para que las micro perlas que contienen el complejo antígeno – anticuerpo de E. coli, quedan adheridas a la pared del tubo.

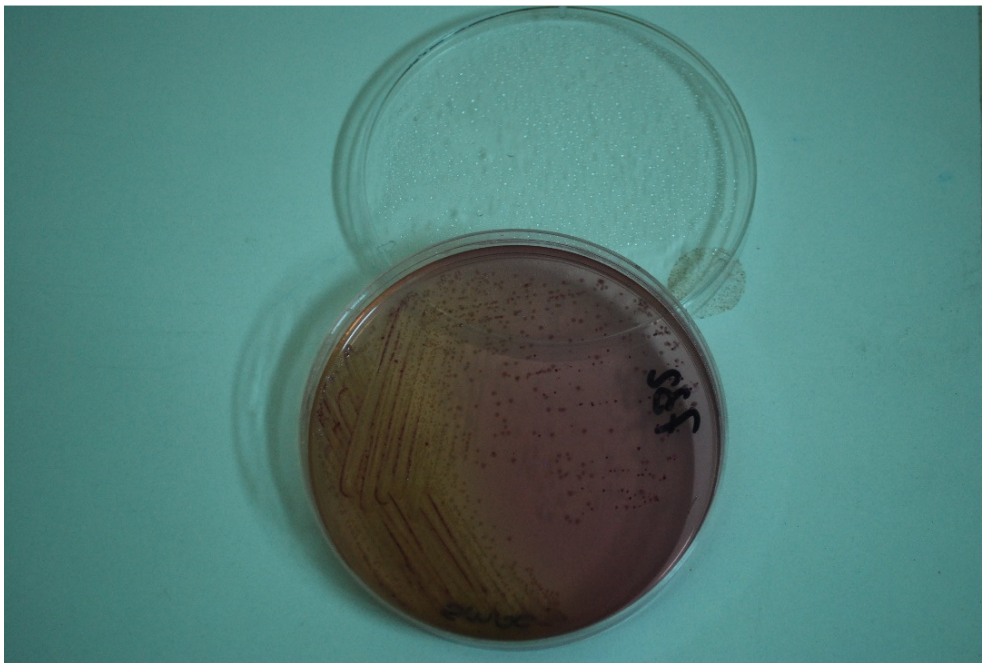


Foto 8: Placa de Agar Sorbitol – McConkey Sorbitol + cefixima telurito + suplemento MUG (SMAC_{CT}) para seleccionar las colonias de E. coli O157:H7 que no fermentan de este azúcar, que aparecen de color amarillo pajizo.

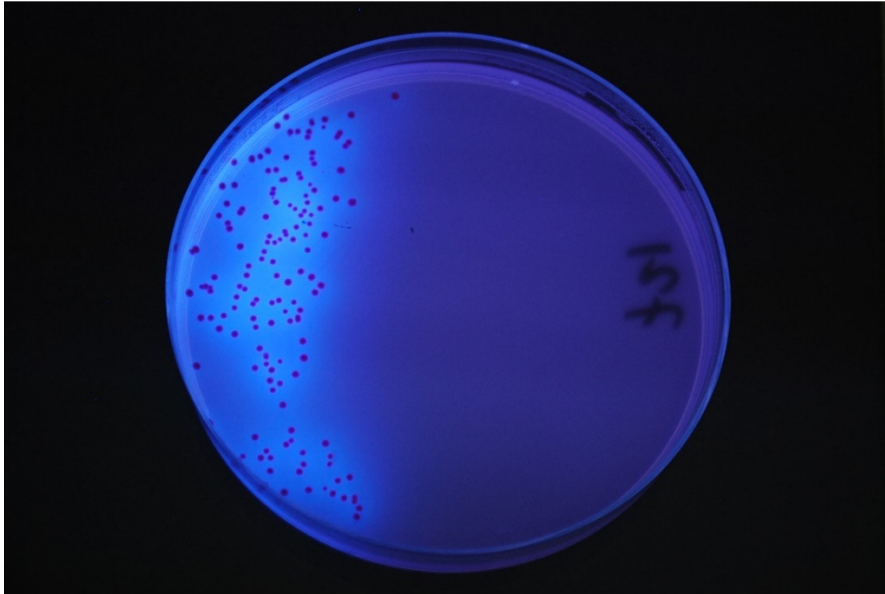


Foto 9: Placa de Agar Sorbitol – McConkey Sorbitol + cefixima telurito + suplemento MUG (SMAC_{CT}) mostrando las colonias de *E. coli* que fermentan de este azúcar y al complemento MUG, que aparecen de color rojizo y mostrando fluorescencia.

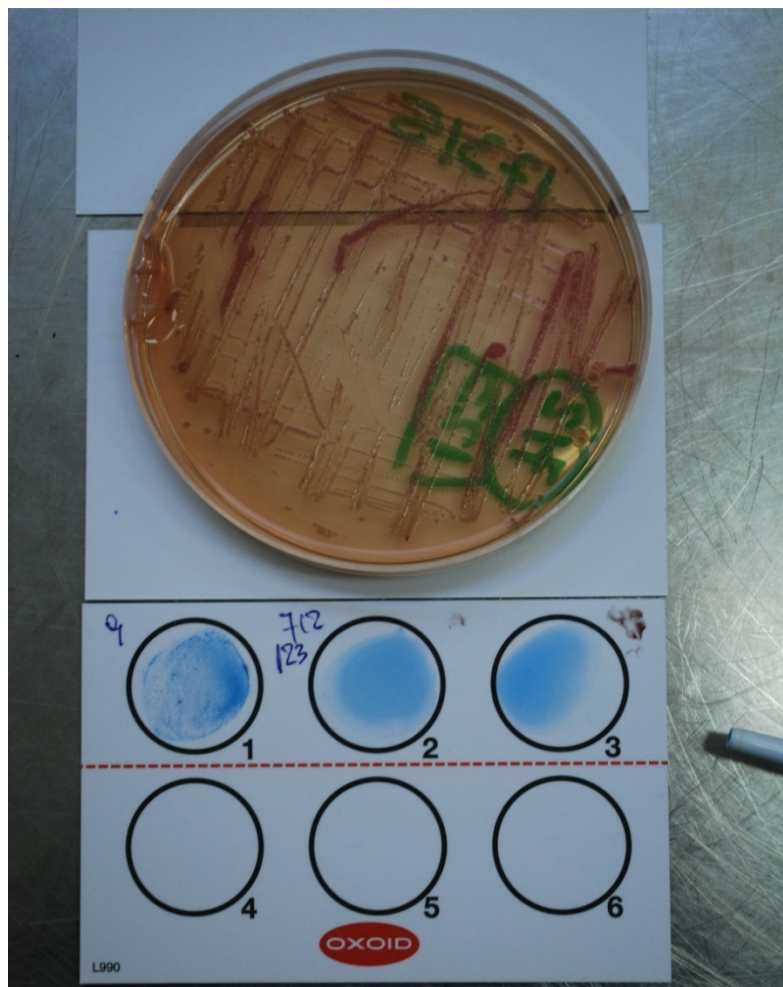


Foto 10: Placa con crecimiento de colonias de *E. coli* O157:H7 y tarjeta mostrando reacción de aglutinación positiva (círculo 1) a la prueba de latex, confirmando la presencia de *E. coli* O157:H7.

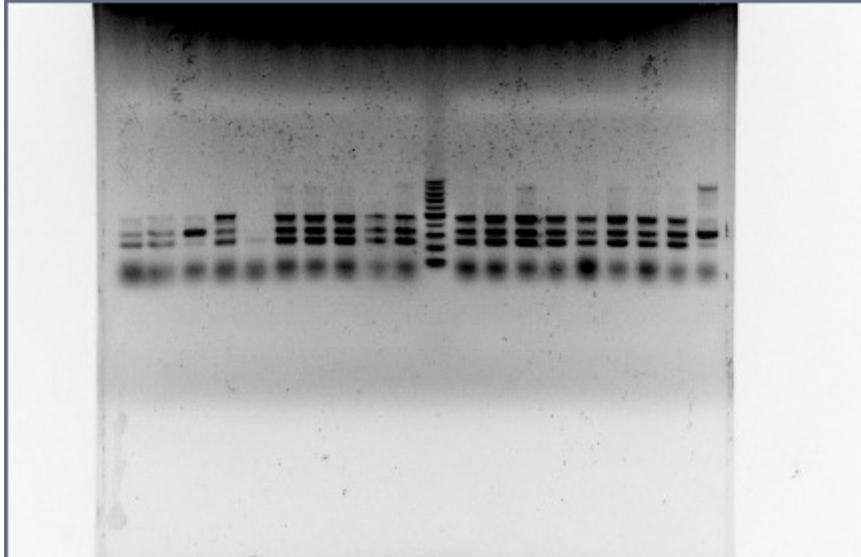


Foto 11: Visualización de la reacción de PCR en medio de gel de agarosa, que permite detectar los genes de la región constante de intimina (*eae*), de las toxinas Shiga (Stx1 – Stx2 y del responsable de la síntesis del antígeno O (*rfbO*₁₅₇))



Foto 12: Proceso de desollado de los animales en el sector sucio de la planta frigorífica

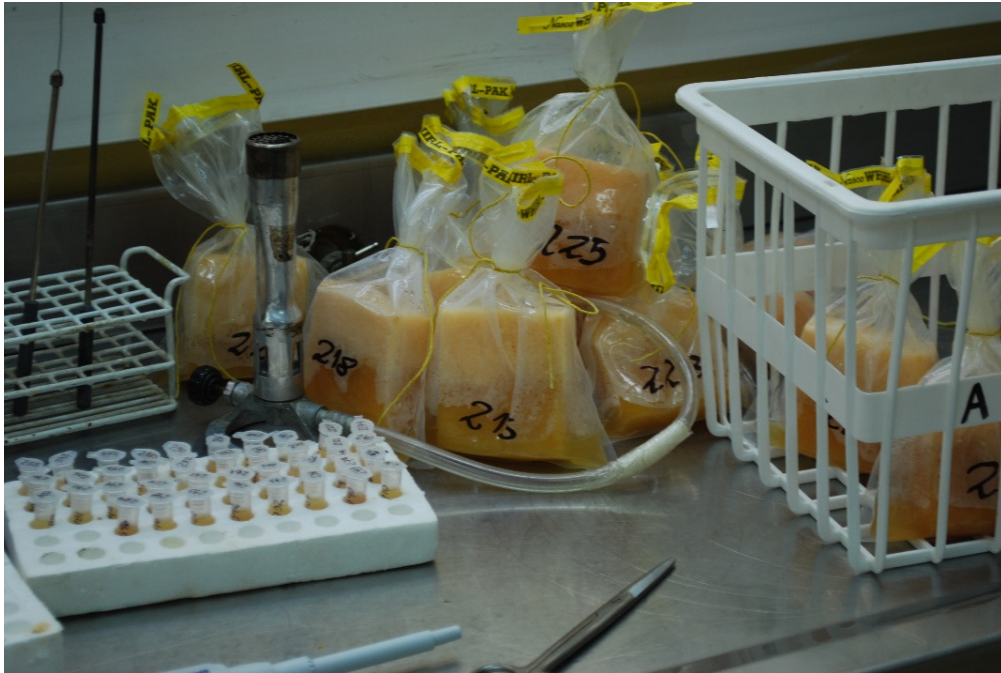


Foto 13: Procesamiento de las muestras del esponjado de las medias reses para realizar la SIM y posterior cultivo selectivo en Agar Mac Conkey Sorbitol + cefixima telurito (SMAC_{CT}) + suplemento MUG, el análisis de aglutinación (Latex), el repique en Agar Mac Conkey.

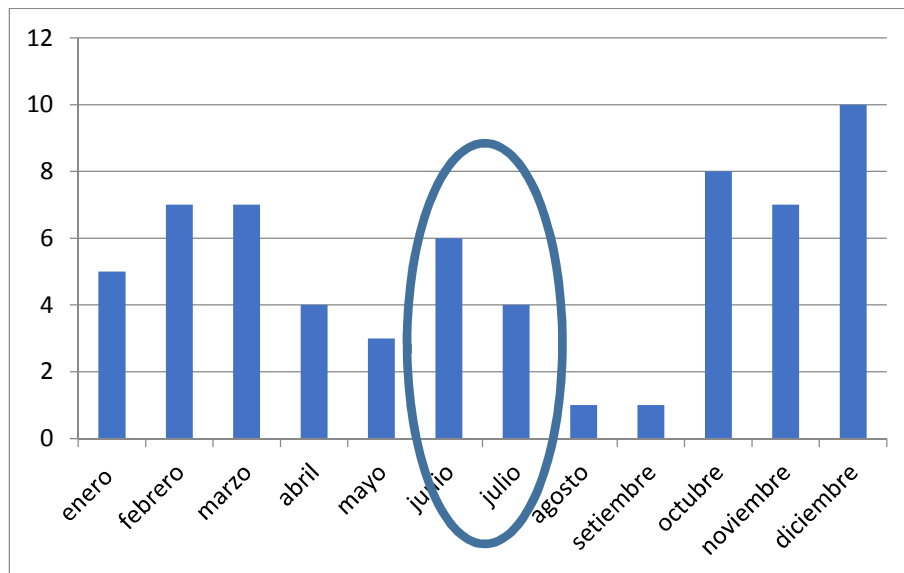


Gráfico 13: Distribución de casos de SUH según mes de ocurrencia- La Pampa - años 2005-2013 (n=63) Sistema de Vigilancia, Unidad Centinela SUH, Hospital Lucio Molas, La Pampa, destacándose la ocurrencia de casos en los meses de invierno.

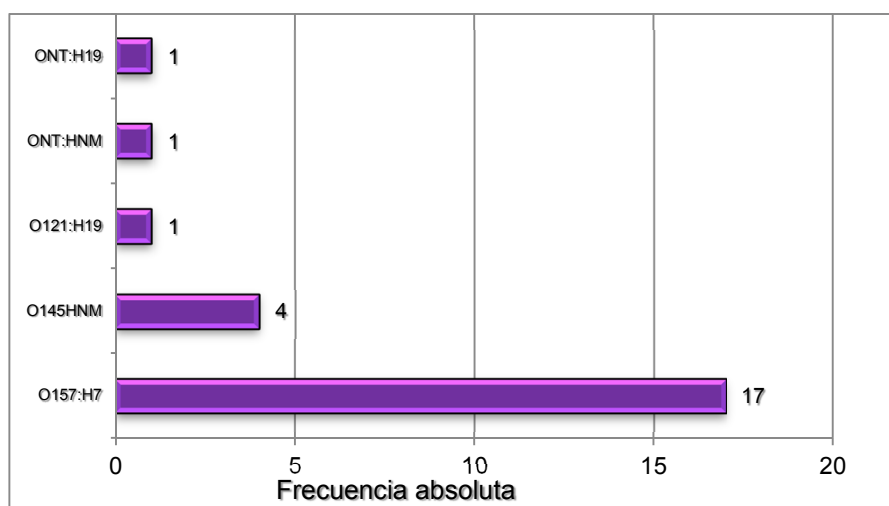


Grafico 14: Serotipos de STEC en casos de SHU-UC (Unidad Centinela) Hospital Lucio Molas Santa Rosa, La Pampa, año 2005 a 2013 (Laboratorio de Bacteriología Hospital Lucio Molas)

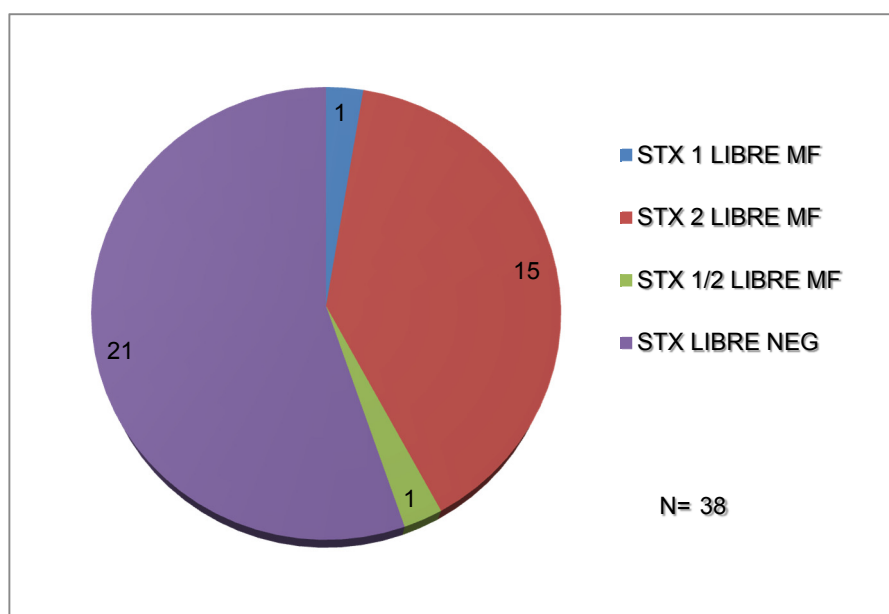


Grafico 15: Toxina Shiga libre en MF - casos SHU-UC Hospital Lucio Molas - Santa Rosa - La Pampa, año 2005 al 2013 (Laboratorio de Bacteriología Hospital Lucio Molas)

10.1.- Información complementaria: trabajos presentados

10.1.1.- IV Seminario de Investigación en Extensión - Centro Regional La Pampa – San Luis – Maestría Sociedad e Instituciones de la Facultad de Ciencias Económicas, Jurídicas y Sociales de la Universidad Nacional de San Luis

Presentación Plan de Tesis, sometiéndose a evaluación y posterior devolución por parte de los moderadores del plenario

10.1.2.- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – XXI Reunión Científico Técnica “Dr. Bernardo Jorge Carrillo”

“Efecto de Factores Predisponentes Sobre la Transmisión y Persistencia de E. coli O157:H7 en Bovinos”

10.1.3.- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – XXI Reunión Científico Técnica “Dr. Bernardo Jorge Carrillo”

“Estudio Longitudinal Sobre Transmisión y Persistencia de E. coli O157:H7 en Bovinos”

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- [1] Edwards S., Nord, C. E. Identification and characterization of micro organism isolated from infected primary teeth. J Int Assoc Dent Child. Dec 1972; 3(1):15-8.
- [2] Gyles, C. L.; Classification of Escherichia coli in Domestic Animals and Humans. Ed CAB int., Wallingfords, UK. 2007: 31-72
- [3] Whittam, T. S.; Wolfe M. L.; Wachsmuth, I. K.; Orskov, I.; Wilson, R. A., clonal relationships among Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infec. Inmun. May 1993; 61(5):1619-29
- [4] Borie, C.; Monreal, Z.; Guerrero, P.; Snachez, M. L.; Martínez, J.; Arellano, C.; Prado, V. Prevalencia y caracterización de Escherichia coli enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos, faenados en Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. Valdivia 1997; Vol. 29 N° 2.
- [5] Nataro, J. P.; Kaper, J. B., Diarrheagenic Escherichia coli. Microbiology. 1998; 11:142-201
- [6] Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T., Pathogenic Escherichia coli. Microbiology, 2004; 2: 123-140.
- [7] Leotta, G.; Curso "Escherichia coli productor de toxina Shiga en alimentos". OIE – CEBASE – SENASA. Buenos Aires junio 2015
- [8] Informe Técnico brote de síndrome urémico hemolítico en Alemania - UNAGESP, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú - Junio 1, 2011 http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/revision_sist7/Brote%20s%C3%ADndrome%20ur%C3%A9mico%20hemol%C3%ADtico%20Alemania%20Mayo%202011.pdf
- [9] Caletti, M. G.; Petetta, D.; Jait, M.; Casaliba, S.; Gimenez, A.; Evaluación de costos directos e indirectos del tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico en sus distintas etapas evolutivas. Medicina. Buenos Aires 2006; 66:22-26.

- [10] Pennington, H.; Escherichia coli O157. Lancet. 2010; 376: 1428 – 1435.
- [11] Griffin, M. G.; Miner, P. B. Jr. Conventional drug therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin. North Am. Review. Sep 1995; 24 (3): 509 – 21.
- [12] Mercado, E. Control de Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino. Medicina. Buenos Aires 2006; 66 (Supl. III): 33-36
- [13] Vilte, D. A.; Larzabal, M.; Cataldi, A. A.; Merado, E. C.; Bovine colostrum contains immunoglobulin g antibodies against Intimin, espA, and espB and inhibits hemolytic activity Mediated by the type three secretion system of Attaching and effacing *Escherichia coli*. Clinical And Vaccine Immunology. Aug. 2008; 1208–1213.
- [14] Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del Agente Etiológico, Reservorios y Vías de Transmisión. Servicio de Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermadades Infecciosas – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires. Medicina. Buenos Aires 2006; 66 (Supl. III): 27-32.
- [15] Mc Daniel, T. K.; Kaper, J. B., A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K12. Mol. Microbiol. 1997; 2: 399-407.
- [16] Phillips, A. D.; Navabpour, S.; Hicks, S.; Dougan, G.; Wallis, T.; Frankel, G.; Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer’s patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine; Gut. 2000; 47: 377–381.
- [17] Naylor, S. W.; Christopher Low, J.; Besser, T. E.; Mahajan, A.; Gunn, G. J.; Pearce, M. C.; McKendrick, I. J.; Smith, D. G. E.; Gally, D. L.; Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in the Bovine Host. Infection and Immunity. Mar. 2003; Vol. 71, No. 3: 1505–1512.
- [18] Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., & Woolhouse, M. (2008). Super shedding and the link between human infection and livestock carriage of Escherichia coli O157. Nature Reviews Microbiology. 2008; 6(12): 904-912.

- [19] Vidal, J. E.; Canizález – Román, A.; Gutierrez- Jiménez, J.; Navarro – García, F.; Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública Mex. Cuernavaca* Sept/Oct 2007; vol.49 N° 5
- [20] Galan, J. E.; Colmer, A.; Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* ; 284 (5418): 1322-8 Review, 1999 May 21
- [21] Wells, J. G.; Shipman, L. D.; Greene, K. D.; Sowers, Green, J. H., E. G.; Cameron, D. N.; Downes, F. P.; Martin, M. L.; Griffin, P. M.; Ostroff, S. M.; Isolation of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29 (5): 985-989.
- [22] Hartland, E. L.; Batchelor, M.; Delahay, R. M.; Hale, C.; Matthews, S.; Dougan, G.; Knutton, S.; Connerton, I.; Frankel, G.; Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells; *Molecular Microbiology*. 1999; 32(1): 151-158
- [23] Frankel, G.; Philips, A. D.; Novakova, M.; Batchelor, M.; Hicks, M.; Dougan, G.; Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Molecular microbiology*. 1998; 29(2): 559-570.
- [24] Goosney, D. L.; Gruenheid, S.; Finlay, B. B.; Gut feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000;16:173–89
- [25] Méndez Alvarez, S.; Pérez Roth, E.; La PCR en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Clínicas*. España 2004; 22 (3): 182 – 192.
- [26] Rojas - Herrera, R. A.; González-Flores, T.; Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*. Abril-Junio 2006: Volumen 31 N° 2: 69-76.
- [27] Fratamico, P. N.; Sackitey, S. K.; Wiedmann, M.; Yi Deng, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(8): 2188-2191.

[28] Calafat, M.; Gigli, I.; Molas, M. L.; Aimar, D.; Rosello, P.; Técnicas básicas de biología molecular en la producción agropecuaria: fundamentos y aplicaciones. Guía de trabajos prácticos curso de postgrado. Escuela de postgrado de la Facultad de Agronomía, UNLPam. Mayo 2015.

[29] Müllis, K. B.; [The unusual origin of the polymerase chain reaction](#). Scientific American. 1990; 262(4): 56-61.

[30] Jeon, S. J.; Elzo, M.; DiLorenzo, N.; Lamb, G. C.; Jeong, K. C.; Evaluation of animal genetic and physiological factors that affect the prevalence of Escherichia coli O157 in Cattle. PloS One. 2013; 8(2): e55728.

[31] Leotta, G. A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I. C.; Mottez, M.; Ferrer, M.; Marey, E.; Rivas, M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de Escherichia coli productor de toxina shiga. Revista Argentina de Microbiología. 2005, 37: 1 – 10.

[32] Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M. P.; González, E. A.; Bernárdez, M. I.; Blanco, J.; Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin) -Producing Escherichia coli Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae*). Journal of Clinical Microbiology. Feb. 2004: 645–651.

[33] Paton, A. W.; Paton, J. C.; Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* and enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36(2): 598-602

[34] Alonso, M. P.; González, E. A.; Bernárdez, M. I. Epidemiology of verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) in ruminants. Verocytotoxigenic E. coli. 2001; vol. 113.

[35] Vilte, D. A.; Larzábal, M.; Cataldi, A. A.; Mercado, E. C.; Bovine Colostrum Contains Immunoglobulin G Antibodies against Intimin, EspA, and ESPB and Inhibits Hemolytic Activity Mediated by Type Three Secretion System of Attaching and Effacing Escherichia coli. Clinical and Vaccine Immunology. 2008; 15 (8): 208-1213

- [36] Naylor, S. W.; Low, J. C.; Besser, T. E.; Mahajan, A.; Gunn, G. J.; Pearce, M. C.; McKendrick, I. J.; Smith, D. G. E.; Gally, D. L. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*. 2003; 71(3):1505 – 1512
- [37] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Documento El INTA que queremos – Plan Estratégico Institucional 2005 / 2015. Buenos Aires, Diciembre 2004.
- [38] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Documento Programa Nacional de Carnes. Perfil de las cadenas: Bovina, Aves, Cerdos, Ovinos y Caprinos. Coordinador Ing. Agr. Daniel Rearte, EEA Balcarce, 2010
- [39] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, La Producción de Carne en la Argentina, Programa Nacional de Carnes, Coordinador Ing. Agr. Daniel Rearte, Setiembre 2007
http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/48-ProdCarneArg_esp.pdf
- [40] Atwill, E., Dahlgren, R., & Knox, A. Management reduces *E. coli* in irrigated pasture runoff. *California Agriculture*. 2007; 61(4): 159 – 165.
- [41] Chase-Topping, M.; Gally, D.; Low, C.; Matthews, L.; Woolhouse, M. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(12): 904 – 912.
- [42] Sanz, M. E.; Viñas, M. R.; Parma, A. E.; Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*. 1998; 14(4): 399 – 403
- [43] Ferens, W.; Houde, C. *Escherichia coli* O157 H7: Animal reservoir and sources of human infection. *Food borne Pathogens and disease*. 2011; 8(4): 465 – 487.
- [44] Olvera, A.; Signorini, M.; Tarabla, H. *Escherichia coli* verotoxigénica: modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas en Argentina. *Revista Panamericana de salud Pública*. 2010; 27(6): 403 – 413.

- [45] Hussein, H. S. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*. 2007; 85(3):63 – 72.
- [46] Parma, A. E.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Viñas, M. R.; Blanco, M.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I.; Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *European Journal of Epidemiology*. 2000; 16: 757-762.
- [47] Fey, P. D.; Wickert, R. S.; Rupp, M. E.; Safranek, T. J.; Hinrichs, S. H.; Prevalence of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. *Emerging Infectious Diseases*. 2000; 6(5): 530 – 533.
- [48] Tanaro, D. J.; Piaggio, M. C.; El síndrome urémico hemolítico, una enfermedad presente entre nosotros. Cátedra de Microbiología y Parasitología – Universidad Nacional de Entre Ríos, http://intra.fb.uner.edu.ar/scripts/agenda/my_documents/my_files/187_Articulo_S_UH_Microb_y_Parasit_con_pass.pdf Consultado 15/09/2015
- [49] Chinen, I.; Tanaro, J. D.; Miliwebsky, E.; Lound, L. H.; Chilemi, G.; Ledri, S.; Baschikier, A.; Scarpin, M.; Manfredi, E.; Rivas, M.; 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J. Food Prot.* 2001; 64 (9): 1346 – 1351
- [50] Eblen, D. R.; Public health importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC) in the US food supply. US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/PDF/STEC>. 2007; vol. 101207
- [51] Pianciola, L.; Navello, M.; Fernández, C.; Gonzalez, G.; Di Russo, V.; Amarilla, N.; Mazzeo, M.; Cepas hipervirulentas de *Escherichia coli* O157:H7: detección en Neuquén de un linaje asociado a patologías severas. Libro de resúmenes XII Congreso Argentino de Microbiología. 2010: 212 – 270.
- [52] G. Flores, T.; R. Herrera, R. F. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de Mexico*. 2005; 47(5): 388 – 390.

- [53] Sader, H. S. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica. ¿Cómo estamos? Rev. Chil. Infectol. 2002; (1): S5 - 3
- [54] Trucco A., O.; Prado J., V.; Duran T., C. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES. Informe primer semestre 2001. Rev. Chil. Infectol. 2002; 19(2): S140 – 148.
- [55] Pujol, M. C. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. Rev Cubana Med. Gen. Integr. 2002; 18(2) - *versión On-line* http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21252002000200012&script=sci_arttext
- [56] Pordomingo, A. Feedlot – Alimentación, diseño y manejo. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2013; Publicación Técnica N° 95.
- [57] Owen, F. N.; Gill, D. R.; Secrist, D. S.; Coleman, S. W. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. Journal of animal science. 1995; 73(10): 3152-3172
- [58] Seijo, A. Epidemias en el Siglo XXI en la Argentina. Temas de Zoonosis V, Asociación Argentina de Zoonosis. Bs. As. 2011; Capítulo 1: 27 – 34.
- [59] Borie, C.; Monreal, Z.; Guerrero, P.; Sanchez, M. L.; Martínez, J.; Arellano, C.; Prado, V. Prevalencia y caracterización de Escherichia coli enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos, faenados en Santiago, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. 1997; 29(2): 205 – 212.
- [60] Paton, A. W., & Paton, J. C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(1): 271-274.
- [61] Sparo, M. D.; Schell, C. M. Bacterias zoonóticas y alimentos. Asociación Argentina de Zoonosis. Temas de Zoonosis V. 2011; Capítulo 43: 379 – 386.
- [62] Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leota. G. A.; Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del Agente Etiológico, Reservorios y Vías de Transmisión. Medicina. 2006; 66(3): 27-32.

[63] Meichtri, L.; Miliwesbsky, E.; Gioffré, A.; Chinen, I.; Baschkier, A.; Chilemi, G.; Guth, B.; Masana, M.; Cataldi, A.; Rodríguez, H. R.; Rivas, M. Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 96(2): 189 -198.

[64] Chase-Topping, M.; Gally, D.; Low, C.; Matthews, L.; Woolhouse, M. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(12): 904 – 912.

[65] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Documento Programa Nacional de Carnes. Perfil de las cadenas: Bovina, Aves, Cerdos, Ovinos y Caprinos. Coordinador Ing. Agr. Daniel Rearte, EEA Balcarce, 2010

[66] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, La Producción de Carne en la Argentina, Programa Nacional de Carnes, Coordinador Ing. Agr. Daniel Rearte, Setiembre 2007

http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/48-ProdCarneArg_esp.pdf

[67] Knox, A.; Tete, K.; Dahlgren, R.; Atwil, E. Management reduces *E. coli* in irrigated pasture runoff. *California Agriculture*. 2007; 61(4): 159 – 165.

[68] Hussein, H. S. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*. 2007; 85(3): E63 – E72.

[69] Le Jeune, J. T.; Wetzel, A. N. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Journal of Animal Science*. 2007 85(13_suppl): E 73 – E 80.

[70] Stephens, T. P.; McAllister, T. A.; Stanford, K. Perineal swabs reveal effect of super shedders on the transmission of *Escherichia coli* O157 H7 in comercial feedlots. *Journal of Animal Science*. 2009; 87(12): 4151 – 4160.

- [71] Stephens T.P.; McAllister T.A.; Stanford K., Development of an experimental model to assess the ability of Escherichia coli O157:H7-inoculated fecal pats to mimic a super shedder within a feedlot environment. *Journal of Food Protection*. 2008; 71(3): 648-52.
- [72] Olvera, A.; Signorini, M.; Tarabla, H. Escherichia coli verotoxigénica: modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas en Argentina. *Revista Panamericana de salud Pública*. 2010; 27(6): 403 – 413.
- [73] Menrath, A.; Wieler, L. H.; Heidemanns, K.; Semmler, T.; Fruth, A.; Kemper, N. Shiga toxin producing Escherichia coli: identification of non O157:H7 – Super Shedding cows and related risk factors. *Gut Pathogens*. 2010; 2(1): 1.
- [74] Matthews, L.; Mckendrick, I. J.; Ternent, H.; Gunn, G. J.; Synge, B.; Woolhouse, M. E. J. Super shedding cattle and the transmission dynamics of Escherichia coli O157. *Epidemiol. Infect.* 2006; 134(1): 131 – 142.
- [75] Norma Internacional ISO 22000 “Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos - Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria”, Primera edición, 2005-09-01- Número de referencia ISO 22000:2005
- [76] Leotta, G. A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I. C.; Mottez, M.; Ferrer, M.; Marey, E.; Rivas, M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de Escherichia coli productor de toxina shiga. *Revista Argentina de Microbiología*. 2005; 37: 1 – 10.
- [77] M. Alvarez, S.; P. Roth, E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas clínicas*. 2004; 22(3): pp 182 – 192.
- [78] Homedes, N.; Ugalde, A. Las reformas de salud neoliberales en América Latina: una visión crítica a través de dos estudios de caso. *Revista Panamericana de salud Pública / Pan American J. Public Health*. 2005; 17 (3): 210 – 220.
- [79] Filho, N. A.; Paim, J. S. La crisis de la salud pública y el movimiento de la salud colectiva en latino América. *Cuadernos medico sociales*. 1999; 75(3): 5 – 30.

[80] Almada, J.; Estrella, P.; Ottavianoni, L.; Pérez, S.; Rodríguez, E.; Chinen, I.; Carbonari, C.; Deza, N.; Miliwebsky, E.; Baschbier, A.; Rivas, M. Relación clonal de E. coli O157 H7 aislada de un caso de SUH, un portador asintomático y muestras de alimentos, La Pampa, Argentina, Asociación de Microbiología Argentina, Simposio VTEC, Bs. As. 2009.

[81] G. Ayala, S. E.; Enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos: un desafío dinámico para la salud pública. Asociación Argentina de Zoonosis, Temas de Zoonosis V. 2011; Capítulo 41: 365 – 373.

[82] Sargeant, J. M.; Gillespie, J. R.; Oberst, R. D.; Phebus, R. K.; Hyatt, D. R.; Bohra, L.; Galland, J. C. Results of a longitudinal study of the prevalence of Escherichia coli O157 H7 on cow calf farm. American Journal of Veterinary Research. 2000, 61(11):1375 – 1379.

[83] Ugalde, A.; Homedes, N. Las reformas neoliberales del sector de la salud: deficit gerencial y alineación del recurso humano en América Latina. Revista Panamericana de Salud Pública / Pan American J. Public Health. 2005; 17(3): 202 – 209.

[84] OMS, La crisis de la salud pública, reflexiones para el debate. Organización Panamericana de la Salud – Oficina Sanitaria Panamericana – Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud – 1992.

[85] G. Flores, T.; R. Herrera, R. F. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud publica Mexico. 2005; 47(5): 388 – 390.

[86] Michaine, S. Escherichia coli O157 H7, la bacteria que disparó el HCCP en la industria de la carne. Enfasis Alimentos. 2003; 9(3): 1 - 7.

[87] Rivas, M.; Masana, M. Síndrome Urémico Hemolítico en la Argentina. Asociación Argentina de Zoonosis. Temas de Zoonosis V. 2011; Capítulo 49:431 – 440.

[88] Ferens, W.; Houde, C. Escherichia coli O157 H7: Animal reservoir and sources of human infection. Food borne pathogens and disease. 2011; 8(4): 465 – 487.

[89] Vidal, J. E.; C. Román, A.; G. Jiménez, J.; N. García, F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de Mexico. 2007; 49(5): 376 – 386.

[90] C. Cuenca, J.; S. Prado, E. A.; M. García, M.; C. Rodríguez, O. Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en terneros lactantes de ganado lechero. REVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2011; 12(2): 1695 – 7504.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020211.html>

[91] Naylor, S. W.; Roe, A. J.; Nart, P.; Spears, K.; Smith, G. E.; Low, J. C.; Gally, D. L. *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the *LEE4* operon. Microbiology. 2005; 151(8): 2773-2781.

[92] Naylor, S. W.; Low, J. C.; Besser, T. E.; Mahajan, A.; Gunn, G. J.; Pearce, M. C.; McKendrick, I. J.; Smith, D. G. E.; Gally, D. L. 1. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Infection and Immunity. 2003; 71(3):1505 – 1512.

[93] Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G. Epidemiología del SUH en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico. Reservorios y vías de transmisión. Revista Medicina. 2006; 66(suplemento 3): 27 – 32.

[94] Woolhouse, M. E. J. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and his implication for control. National Academy of Sciences of the Unites States of America. 2006; 103(3): 547 – 552.

[95] Hussein, H. S., & Bollinger, L. M. (2005). Prevalence of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* in beef cattle. Journal of Food Protection. 2005; 68(10): 2224-2241.

[96] MAGyP
http://www.minagri.gob.ar/site/areas/tierras/02_datos_geodaficos/10_Uso%20del%20suelo/archivos1/090000_Soja/090000_Soja.pdf?PHPSESSID=0f97506f00172fef5543365f68e289e9 revisado 30/09/2015.

[97] Bolsa de Cereales <http://www.bolsadecereales.com/>

[98] FAO <http://www.fao.org/countryprofiles/index/es/?iso3=ARG>

[99] Herrero, M. A.; Gil, S. B.; Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. Ecol. Austral. 2008; 18(3): 274 – 289.

[100] Pengue, W.; Expansión de la soja en Argentina. Globalización, desarrollo agropecuario e ingeniería genética: Un modelo para armar. Revista Biodiversidad, 2001, N° 29.

[101] Rhades, L. C.; Mandrile, D.; García, N.; Merino, G.; Felice, G. A.; Magallanes, C. A.; Pautas técnicas para la correcta instalación y uso de los alambros eléctricos.– INTA Ediciones Centro Regional La Pampa – San Luis. 2015; Boletín de Divulgación Técnica N° 112, 3ª Edición.

[102] Olvera, A.; Signorini, M.; Tarabla, H. Verotoxin-producing Escherichia coli: quantitative model of exposure and risk scenarios in cattle carcasses in Argentina. Revista Panamericana de Salud Pública. 2010; 27(6): 403-413.

[103] Hernández Lezama, L. F. Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio. FAO, Food, nutrition and agricultura. 1999; 25: 34-41.

[104] Etcheverria, A.; Arroyo, G.; Parma, A.; Padola, N. L. Síndrome urémico hemolítico. El rol del bovino como reservorio de Escherichia coli productores de verotoxinas (VTEC). Arch Latin Nefr Ped. 2013; 13(1): 1 – 11.

[105] RASFF - Food and Feed Safety Alerts;

http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm

[106] Fraser, M. E.; Fujinaga, M.; Cherney, M. M.; Melton-Celsa, A. R.; Twiddy, E. M.; O'Brien, A. D.; James, M. N. G. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(26): 27511–27517.

[107] Tironi Farinati, A. C. F.; Acción de la toxina Shiga 2 producida por Escherichia coli enterohemorrágica en el Sistema Nervioso. Universidad de Buenos Aires - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis Doctoral. 2013.

[108] O'Brien, A. D.; Holmes, R. K.; Shiga and Shiga-like toxins - Microbiological reviews. 1987; 51(2): 206.

[109] Croxen, M. A.; Finlay, B. B.; Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. 2010; 8(1): 26-38, 2010.

[110] Paton, A. W.; Paton, J. C.; Detection and characterization of shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays forstx 1, stx 2, eaeA, Enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfb O111, and rfb O157. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36(2): 598-602.

[111] Rabinovitz, B. C.; Uso de factores de virulencia recombinantes en la obtención de anticuerpos calostrales bovinos para la prevención de infecciones por Escherichia coli O157:H7: Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Quilmes. 2014

[112] Griffin, M. G.; Miner, P. B. Jr.; Conventional drug therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin. North Am. 1995; 24(3): 509-521.

[113] Jeon, S. J.; Elso, M.; DiLorenzo, N.; Clif Lamb, G.; Kwang Cheol Jeong, Evaluation of animal genetic and physiological factors that affect the prevalence of Escherichia coli O157 in cattle. PloS One. 2013; 8(2): e55728. www.plosone.org

[114] Milnes, A. S., Stewart, I., Clifton-Hadley, F. A., Davies, R. H., Newell, D. G., Sayers, A. R., ... & Evans, S. J. Intestinal carriage of verocytotoxigenic Escherichia coli O157, Salmonella, thermophilic Campylobacter and Yersinia enterocolitica, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. Epidemiology and infection. 2008; 36(06): 739-751.

[115] Murdan, S.; Gregoriadis, G.; Florence, A. T.; Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigens? European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1999; 8(3): 177-185.

[116] Rivas, M.; Leotta, G.; Chinen, I; Manual de procedimientos diagnósticos y caracterización de Escherichia coli O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2008

[117] E. coli verotoxigénica; Dirección general de laboratorios y control técnico; actividades de control - SENASA – Serie Temática N° 5 - junio 2013.

[118] <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/aquapep.htm> consultado 03/11/2015

[119] http://www.britanialab.com/productos/363_hoja_tecnica_es.pdf consultado 03/11/2015

[120] Recomendaciones para el diseño de un feed lot. Aspectos básicos por considerar en la instalación y manejo de corrales Informe provisto por Revista CREA N° 365 - <http://www.braford.org.ar/wp-content/uploads/Recomendaciones-para-el-diseno-de-un-feed-lot.pdf> consultado 06/11/2015

[121] Van Donkersgoed, J.; Berg, J.; Potter, A.; Hancock, D.; Besser, T.; Klashinsky, S. Environmental sources and transmission of Escherichia coli O157 in feedlot cattle. The Canadian Veterinary Journal. 2001; 42(9), 714 – 720.

[122] Biología de los microorganismos, Universidad de Granada, España, <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/05pared.htm> consultado 09/11/2015

[123] Schouten, J. M., Graat, E. A. M., Frankena, K., Van De Giessen, A. W., Van Der Zwaluw, W. K., & De Jong, M. C. M. A longitudinal study of Escherichia coli O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. Veterinary Microbiology. 2005; 107(3): 193-204.

[124] Edrington, T.; Callaway, T. R.; Ives, S. E.; Engler, M. J.; Looper, M. L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. Seasonal shedding of Escherichia coli O157:H7 in ruminants: a new hypothesis. Foodborne Pathogens and Disease. 2006; 3(4): 413 – 421.

[125] Padola, N.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverria, A.; Arroyo, G. H.; Usera, M.; Parma, A. E.; Serotypes and virulence genes of bovine shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina; *Veterinary Microbiology*. 2004; 100(1): 3 – 9.

[126] Rodríguez, G. (2007). Lecture notes on generalized linear models. URL:
<http://data.princeton.edu/wws509/notes/c4.pdf>

[127] Journal of Tropical Pediatrics (s/f) Chapter 13: Poisson Regression Analysis. *Journal of Tropical Pediatrics*, Online only area, Online Area,
http://www.oxfordjournals.org/our_journals/tropej/online/ma_chap13.pdf

[128] Lavery, Russ. An animated guide: an introduction to poisson regression. NESUG 2010 Proceedings Paper SA 04. 2010;
<http://www.lexjansen.com/nesug/nesug10/sa/sa04.pdf>

[129] Mercado, E. C.; Control de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino; *Medicina*. 2006; 66 (3): 33-36.

[130] Michanie, S.; *Escherichia coli* O157:H7. La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne; *Ganados & Carnes*, Buenos Aires; 2003; Año 3, N° 17: 40-42.

[131] Pedan, A. Analysis of count data using the SAS system. In *Proceedings of the 26th Annual SAS Users Group International Conference*. 2001; 26(4): 226-247.
<http://www2.sas.com/proceedings/sugi26/p247-26.pdf>

[132] Rodriguez, G. Poisson models for count data. *Lecture Notes on Generalized Linear Models*. 2007; <http://data.princeton.edu/wws509/notes>

[133] Fernández, D.; Rodríguez, E. M.; Arroyo, G. H.; Padola, N. L.; & Parma, A. E. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (stx) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 106(4): 1260-1267.

[134] Besser, T. E.; Hancock, D. D.; Pritchett, L. C.; McRae, E. M.; Rice, D. H.; Tarr, P. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157: H7 in cattle. *Journal of Infectious Diseases*. 1997; 175(3): 726-729.

- [135] Laegreid, W. W.; Elder, R. O.; Keen, J. E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. *Epidemiology and Infection*. 1999; 123(02): 291-298.
- [136] Sanderson, M. W.; Sargeant, J. M.; Shi, X.; Nagaraja, T. G.; Zurek, L.; Alam, M. J. Longitudinal emergence and distribution of *Escherichia coli* O157 genotypes in a beef feedlot. *Applied and environmental microbiology*. 2006; 72(12): 7614-7619.
- [137] Jure, M. A.; Condorí, M. S.; Pérez Terrazzino, G.; Catalán, M. G.; López Campo, A.; Zolezzi, G.; Chinen, I.; Rivas, M.; Castillo, M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Rev. Argen. Microbiol.* 2015; 47(2): 125-131.
- [138] Smith, R. P.; Paiba, G. A.; Ellis-Iversen, J. Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Research in Veterinary Science*. 2010; 88: 411-414.
- [139] LeJeune, J. T.; Besser, T. E.; Rice, D. H.; Berg, J. L.; Stilborn, R. P.; Hancock, D. D. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Applied and Environmental Microbiology*. Jan. 2004: 377-384.
- [140] Navárez-Bravo, C. A.; Carruyo-Núñez, G.; Moreno, M.; Rodas-Gonzalez, A.; Hoet, A. E.; State, Z.; Wittum, T. E. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio de Minda, estado de Zulia, Venezuela. *Revista Científica*. 2007; 12(3): 239-245.
- [141] Michanie, S. *Escherichia coli* O157:H7. La bacteria que disparó el HSCCP en la industria de la carne. *Ganados & Cares*. 2003; 3(17):40-42.
- [142] Del Castillo, L. L. Detección y caracterización de *Escherichia coli* O157 de ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina. Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. 2014

- [143] Terrance, M. A.; Keen, J. E.; Bosilevac, J. M.; Brichta-Harhay, D. M.; Kalchayanand, N.; Shckelford, S. T.; Wheeler, T. L. Longitudinal study of Escherichia coli O157:H7 in a beef cattle feedlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75(20): 6515 – 6523.
- [144] Ekong, P. S.; Sanderson, M. W.; Cernicchiaro, N. Prevalence and concentration of Escherichia coli O157 in different seasons and cattle types processed in North America: A systematic review and meta-analysis of published research. *Preventive Veterinary Medicine*. 2015; 121(1): 74-85.
- [145] Van Donkersgoed, J.; Berg, J.; Potter, A.; Hancock, D.; Besser, T.; Rice, D.; Klashinsky, S. Environmental sources and transmission of Escherichia coli O157 in feedlot cattle. *The Canadian Veterinary Journal*. 2001. 42(9), 714.
- [146] Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M.; Swerdlow, D. L. Epidemiology of Escherichia coli O157: H7 outbreaks, United States, 1982–2002. 2005
- [147] Polifroni, R.; Etcheverría, A. I.; Sanz, M. E.; Cepeda, R. E.; Krüger, A.; Lucchesi, P. M.; Padola, N. L. Molecular characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from the environment of a dairy farm. *Current microbiology*. 2012. 65(3): 337-343.
- [148] Grauke, L. J.; Kudva, I. T.; Yoon, J. W.; Hunt, C. W.; Williams, C. J.; Hovde, C. J. Gastrointestinal tract location of Escherichia coli O157: H7 in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. 68(5): 2269-2277.
- [149] Fox, J. T.; Depenbusch, B. E.; Drouillard, J. S.; Nagaraja, T. G. Dry-rolled or steam-flaked grain-based diets and fecal shedding of O157 in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 2007. 85(5): 1207-1212.
- [150] Fernández, D.; Padola, N. Escherichia coli verotoxigénico: varias cuestiones... y los tambos también. *Revista Argentina de Microbiología*. 2012. 44: 312-323.
- [151] Berg, J.; McAllister, T.; Bach, S.; Stilborn, R.; Hancock, D.; LeJeune, J. Escherichia coli O157: H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley-or corn-based finishing diets. *Journal of Food Protection*. 2004. 67(4): 666-671.

[152] Cernicchiaro, N.; Pearl, D. L.; McEwen, S. A.; Zerby, H. N.; Fluharty, F. L., Loerch, S. C.; LeJeune, J. T. A randomized controlled trial to assess the impact of dietary energy sources, feed supplements, and the presence of super-shedders on the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in feedlot cattle using different diagnostic procedures. *Foodborne pathogens and disease*. 2010. 7(9): 1071-1081.

[153] Jacob, M. E.; Callaway, T. R.; Nagaraja, T. G. Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009. 6(7): 785-792.

[154] Edrington, T. S.; Callaway, T. R.; Ives, S. E.; Engler, M. J.; Looper, M. L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathogens & Disease*. 2006. 3(4): 413-421.

[155] Almada, J.; Estrella, P.; Ottavianoni, L.A.; Perez, S.; Rodriguez, E.; Chinen, I.; Carbonari, C.; Deza, N.; Miliwebsky, E.; Baschkier, A.; Rivas, M. Relación clonal de *Escherichia coli* O157:H7 aislada en un caso de SUH, un portador asintomático y muestras de alimentos. *La alimentación latinoamericana*. 2009. 41(281): 56-59

[156] Liu, C.; Hofstra, N.; Franz, E. Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 2013. 163(2), 119-128.

[157] Estrella, P. Jornadas Centenario Hospital Gobernador Centeno, General Pico, La Pampa. Datos epidemiológicos - Vigilancia del SUH, a través de la Unidad Centinela del Hospital Lucio Molas, del SIVILA (Vigilancia de Laboratorio y del SNVS (Sistema Nacional De Vigilancia De La Salud). Power Point; comunicación personal. Septiembre 2014

[158] Marzocca, M. A.; Marucci, P. L.; Sica, M. G.; Alvarez, E.E. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*. 2006. 38: 38-40.

[159] Estrella, P. et al. : Relacion clonal de E. Coli O157:H7 aislada en un caso de SUH, un portador asintomático y muestras de alimentos. La Pampa, Argentina. *Rev. Cárnica Latinoam*. 2008. 158:8-11.

[160] Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M. P.; González, E. A.; Blanco, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *Journal of clinical microbiology*. 2004. 42(2), 645-651.

[161] Paton, A. W.; Paton, J. C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx 1*, *stx 2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb O111*, and *rfb O157*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. 36(2), 598-602.

[162] Olsvik, Ø.; & Strockbine, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. 1993. 271-276.