

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXCRECIÓN DE *ESCHERICHIA coli* O157:H7 EN BOVINOS.

L. C. Rhades¹; M. Larzábal³; A. Bentancor⁵; J. Sabio y García⁶; F.J. Babinec^{1,2}; A. A. Cataldi³; N. Amigo³; V. N. Baldone¹; L. Urquiza¹; P. J. Delicia⁴; M. C. Fort¹

1) EEA INTA Anguil 2) Facultad de Agronomía UNLPam 3) Instituto de Biotecnología INTA
4) UTN Facultad Regional Rosario 5) Facultad Ciencias Veterinarias UBA 6) Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA

RESUMEN

Los bovinos son reservorios primarios de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7, bacteria responsable del síndrome urémico hemolítico (SUH) que afecta a niños menores de 6 años en forma endémica en la Argentina, debido a la producción de las toxinas Shiga (*stx*), la *stx1* y la *stx2*. Estas toxinas producidas en el intestino actúan sobre este órgano, y sistémicamente sobre riñones, cerebro y otros órganos. En este estudio se siguieron 118 terneros de 36 corrales (tres a cuatro animales por corral), que fueron distribuidos en 18 corrales de animales livianos (promedio: 128 kg) y 18 de pesados (promedio: 197 kg), de un establecimiento ganadero de la provincia de La Pampa, Argentina. Los animales se sometieron a tres fases de engorde (recría: marzo - junio de 2014, pastoreo: julio – noviembre, terminación: diciembre 2014 – abril 2015), con una dieta energética con distintos niveles de proteína bruta (PB); recría 9 – 13 – 18% PB, pastoreo 9% PB y terminación 9,5 – 13% PB. Durante un año se hicieron hisopados mensuales de la mucosa recto anal (HMRA), para identificar a los excretores de EHEC O157:H7 y los genes de virulencia de esta bacteria. Las bacterias se caracterizaron por PCR Multiplex. La prevalencia varió de 0.84% en julio hasta 15.25% en noviembre de 2014. Todas las cepas de *E. coli* O157: H7 aisladas portaban *eae*, mientras que 11%, 33% y 56% contenían *stx1*, *stx2* y *stx1 / stx2* respectivamente. El gen *stx1* se encontró solo durante la recría, mientras que *stx2* se mantuvo constante a lo largo del ensayo. Durante el pastoreo, se encontró una presencia significativa de *stx1 / stx2*. Se estudió la influencia de posibles factores predisponentes para la excreción de *E. coli* O157:H7 y la presencia de los genes de virulencia de esta bacteria. Los factores evaluados fueron el peso, la dieta, la época del año, el efecto de las precipitaciones y las temperaturas. Durante la terminación, los animales livianos excretaron significativamente mayor cantidad de *E. coli* O157:H7 que los pesados, mientras que no se hallaron diferencias entre el nivel de

PB de la dieta y la excreción de *E. coli* O157:H7 entre las 3 fases del engorde. Por otro lado, la excreción de *E. coli* O157:H7 y la presencia de los genes que expresan *stx1-stx2* se encontraban aumentadas con el incremento de las lluvias y la temperatura en primavera.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli Entero Hemorrágica (EHEC) O157:H7 es una bacteria zoonótica, habitual de la flora del tracto gastrointestinal (TGI) de humanos y animales homeotermos, incluidos los bovinos, que son un importante reservorio de la bacteria. (Borie et al.; 1997). *E. coli* O157:H7 es portadora de las toxinas Shiga (*stx*), la *stx1* y la *stx2*, que son los principales factores de virulencia. *E. coli* O157:H7 es, además, la primera fuente de infección para los humanos que la ingieren a través de los alimentos contaminados, lo que provoca distintos síndromes diarreicos y enfermedades severas, incluso mortales. *E. coli* O157:H7 es responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), enfermedad endémica en Argentina, que afecta a niños menores de 6 años, como consecuencia de la producción de *stx* en el intestino que actúan sobre riñones, cerebro y otros órganos. (Nobili, G, et al. 2017, Sparo, M. D. et al. 2011; Olvera, A. et al. 2010; Almada et al. 2009; Mercado, M., 2007; Rivas, M. et al. 2006; Hussein, H. S. et al. 2005; Leotta, G. et al. 2005).

A nivel mundial, entre el 52,2 y el 69,0% del ganado bovino de carne sano excreta *E. coli* O157:H7. Estudios realizados en Escocia por Chase-Topping, M. 2008 demostraron que el 20% de los animales de las granjas muestreadas estaban infectados con *E. coli* O157:H7. Blanco, M. et al. 2004 indicaron que en España el 95% de las granjas examinadas estaban contaminadas con *E. coli* O157:H7 y dentro de estas granjas, el 37% de los terneros y el 27% de las vacas eran excretores.

Laegreid, W. et al., 1999 encontraron que en el 100% de los rodeos analizados en Canadá, los terneros recién destetados estaban expuestos a *E. coli* O157:H7 y el 83% eran excretores antes de llegar a los corrales de engorde.

En la provincia de Buenos Aires, Argentina, Del Castillo, L.L. 2015 determinó que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en bovinos era del 10,5 % en terneros, del 8,5% en vaquillonas, 5,1% para los novillitos, 3,5% para los novillos y 1,5 % en vacas.

En 2 estudios realizados en feedlots de EEUU y Canadá, se encontró presencia de *E. coli* O157:H7. En un feedlot (2000 animales) analizado en EEUU, la prevalencia de esta bacteria fue de 36,7%, 5 semanas después del arribo de los terneros al establecimiento (Sanderson, M. W. et al, 2006). Por otra parte, en el de Canadá (75000 animales), la prevalencia de *E. coli* O157:H7 fue de 7,4% al destete y 7 días después del arribo de los animales al feedlot fue del 15% (LeJeune J. T. et al, 2003).

En un estudio longitudinal realizado por Hallewell, J. et al., 2016, sobre terneros recién destetados con destino a un feedlot de Canadá, encontraron que a los 30 y a los 135 días de encierro, la prevalencia de *E. coli* O157:H7 aumentaba del 66,7 al 90%.

En una revisión bibliográfica, LeJeune y Wetzel (2007) discuten varios factores que afectan la susceptibilidad a la infección con esta bacteria. Entre los factores que mencionan están la dieta, el peso, la edad, la higiene y densidad de animales en los corrales. Por ejemplo, Wells et al. (1991) informaron que, en su estudio, los terneros excretan más *E. coli* O157:H7 que los novillos, mientras que Dargatz et al (1997) vieron que los animales con peso inferiores a 317 kg mostraban mayor índice de excreción que los animales de mayor peso.

En un estudio longitudinal llevado a cabo en Australia, en el que se muestrearon semanalmente 52 vaquillonas lecheras, que pastoreaban pasturas y a las que se les suplementó la dieta con heno y pellets con alto contenido proteico, se observó que la condición corporal de los animales analizados estaba positivamente asociada con el incremento de la excreción de *E. coli* O157 (Williams, K. J., et al. 2015).

En un estudio comparativo entre la composición de la dieta y el comportamiento de la excreción de *E. coli* O157:H7 en novillos encerrados, Berg, J. et al., (2004) encontraron que la prevalencia era del 2,4% en los alimentados en base a grano de cebada y del 1,3%

en los alimentados en base a grano de maíz. Estos resultados sugieren que esta diferencia podría estar dada por el Ph de la materia fecal, que en el caso de la dieta a base de maíz era más bajo.

La evaluación de los efectos de la alimentación (maíz húmedo o seco, suplementados con dos aditivos nutricionales distintos) sobre la excreción de *E. coli* O157:H7 en 168 novillos (de 24 corrales) determinó que los animales alimentados con maíz entero presentaron mayor prevalencia que los animales alimentados con maíz húmedo; sin embargo, estas diferencias obedecieron al tipo de aditivo utilizado (Cernicchiaro, N. et al., 2010).

Si bien la composición de la dieta tiene incidencia en la excreción y prevalencia de *E. coli* O157:H7 en los bovinos, los mecanismos específicos responsables del aumento o disminución de la excreción aún no se conocen muy bien y podrían obedecer a cambios en la bioecología del intestino grueso, inducida por la variedad de ingredientes que se utilizan para la formulación de las dietas (Jacob, M. E. et al., 2009).

En un estudio realizado en frigoríficos argentinos, se observó que 39% de los novillos (14 a 16 meses de edad) alimentados a base a granos excretaban *E. coli* O157:H7 y que esta excreción estaría relacionada con un factor alimenticio (Meichtri, L. et al., 2004).

Por otro lado, bovinos destinados a la industria de la carne mostraron una disminución en la excreción de *E. coli* O157:H7 cuando pasaron abruptamente de consumir una dieta a base de grano de maíz a un pastoreo directo a campo (Mercado, E. C., 2006).

En Kansas (USA), la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en terneros destetados en setiembre (otoño) provenientes de pasturas, fue de del 5%, previo a la entrada a un feedlot (Terrance, M. A. et al., 2009). Los investigadores determinaron que la influencia estacional podría haber actuado como factor predisponente para la excreción.

Los trabajos de LeJeune, J. T. et al. 2004; Rangel, J. M. et al. 2005; Edrington, T. et al. 2006; Hussein, H. S. et. al., 2007 y Ekong, P. S. et al. 2015 coinciden con la existencia de picos de prevalencia estacionales de *E. coli* O157:H7 en verano. En Argentina, Padola, N.; et al. 2004 y Fernández, D., et al. 2012, informan también una mayor prevalencia de *E. coli* O157:H7 en terneros de tambo en épocas cálidas.

Por otro lado, los reportes de Chase-Topping, M. et al., 2008, indican que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en bovinos de carne en Escocia fue más elevada en invierno (20%) que en el verano (8,7%). Estos resultados coinciden con los informes de Ogden et al. 2004.

Si bien la mayoría de los estudios antes mencionados, informan una mayor prevalencia de *E. coli* O157:H7 en las épocas cálidas (primavera-verano), en ninguno de estos trabajos se reporta una correlación entre la prevalencia de *E. coli* O157:H7 y la incidencia de la temperatura y las precipitaciones registradas las semanas anteriores a cada muestreo.

Los resultados del estudio longitudinal ya mencionado de Williams, K. J. et al., 2015 determinó que las temperaturas máximas, las precipitaciones, la humedad relativa y la exposición a la luz solar estaban asociadas con la excreción de *E. coli* y que existía a su vez una relación entre las precipitaciones y la presencia de animales súper excretores. En coincidencia, los reportes de Money, P. et al. 2010 en Escocia, indicaron que la excreción de *E. coli* O157:H7 tenía una relación con las precipitaciones.

Fink, R. C. et al. (2018), en un estudio longitudinal realizado sobre 4138 novillos y vaquillonas provenientes de dos zonas distintas del medio oeste de USA y alimentados con residuos de granos de destilería, encontraron que la prevalencia invernal (9,8%) y la primaveral (7,4%) de *E. coli* O157, fue menor a la del otoño (14%). Sin embargo, reportaron que la temperatura y las precipitaciones no tuvieron impacto sobre la excreción de EHEC O157.

En 952 rodeos de carne en Escocia, Gunn, I. J. et al. 2007, encontraron una prevalencia del 7,9% de *E. coli* O157:H7, las que en un 0,2% expresaban *stx1*, 94,9% portaban *stx2*, y 4,9% portaban *stx1 - stx2*; y en todos los aislamientos se identificó la presencia del gen *eae*.

En un estudio de 3 años en 14 establecimientos de la región Pampeana sobre 244 bovinos de carne en pastoreo, todas las cepas de *E. coli* O157:H7 (76,92%) portaban el gen *eae* (Parma et al., 2000). Por otro lado, en un estudio realizado en frigoríficos exportadores en Argentina, la prevalencia de *E. coli* O157:H7 previo a la faena en terneros fue del 4,1% y todas las cepas aisladas portaban el gen *eae* (Masana, M. O. et al. 2010).

En el trabajo ya mencionado de Blanco, M. et al. 2004, el 20% de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 portaban los genes *stx1*, el 54% poseía el gen *stx2* y el 26% portaban ambos genes (*stx1 - stx2*). Además, el gen *stx1* predominaba en las cepas aisladas en terneros y el gen *stx2* en las cepas de los animales de mayor edad.

El trabajo ya citado de LeJeune et al. (2004) indicó que las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas en un feedlot con 75000 de Canadá, portaban los genes *stx1 - stx2* en 83% de las muestras. Los genes para *stx2* y *stx1* estaban en 16% y 0,43% respectivamente.

En los estudios de Polifroni, et al. (2012) y Fernández et al. (2012), detectaron una mayor prevalencia de los genes *stx1 - stx2* y una menor prevalencia de *stx1* en estaciones cálidas, mientras que la del gen *stx2* se mantuvo estable en todas las estaciones del año.

En la Argentina, Padola, N. et al. 2010 informaron prevalencias del 20% para la presencia del gen que codifica la expresión de la *stx2*, 9% para el gen *stx1* y 4% para la presencia de ambos genes *stx1 - stx2*, sobre 126 terneros y 118 vacas lecheras, lo que indica que los hallazgos del gen *stx2* son más comunes en animales de mayor edad.

MATERIALES Y METODOS

El uso de los animales en este estudio fue previamente aprobado por el **Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)** de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y los procedimientos estándar de bioseguridad y seguridad se llevaron a cabo en línea con los procesos institucionales.

Se utilizaron 118 terneros machos, recién destetados (marzo de 2014), de entre 4 y 6 meses de edad y 87 a 224 kg de peso. Se los encerró, en 36 corrales paralelos, de 4 m de frente por 15 m de profundidad, contruidos *ad hoc*, con 3 a 4 terneros en cada uno. Los terneros fueron distribuidos en bloques por peso en: livianos y pesados, quedando 18 corrales para los livianos y 18 para los pesados. Desde el 19 de marzo al 10 de junio (84 días), los animales fueron alimentados con una dieta energética con 3 niveles distintos de proteína bruta (PB): 9; 13 y 18% respectivamente. La dieta consistió en harina de soja, grano de maíz y heno de mijo, con un complemento vitamínico – mineral y un ionosforo modulador de la fermentación ruminal.

La disposición de los bloques en los corrales fue como sigue: 6 corrales con bajo nivel de PB, 6 con nivel medio y 6 con nivel alto de PB.

Desde el 11 de junio al 24 de octubre (135 días), los animales pasaron a pastorear 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), con un 9% de PB.

A partir del 25 de octubre hasta el 26 de noviembre (32 días), los animales recibieron una dieta de acostumbamiento con 9% de PB, consistente en heno y avena (*Avena sativa*) en grano.

A partir del 27 de noviembre hasta el 7 de abril de 2015 (131 días), los novillitos vuelven a los corrales, guardando la distribución fijada al inicio del ensayo, para iniciar la última etapa de engorde. En este período se administran 2 dietas; una con 9,5% y otra con 13% de PB. Ambas dietas son a base de avena y maíz, con el agregado de un complemento vitamínico – mineral y un ionosforo modulador de la fermentación ruminal.

Mensualmente se les tomaron muestras mediante HMRA a todos los animales. Las muestras se incubaron en caldo tripticasa soja (TSB Oxoid Cod: CM0129B), suplementado con vancomicina (Oxoid Cod. SRO186E), cefixima y telurito de potasio (Oxoid SRO172E), utilizando separación inmunomagnética (SIM), (Dynabeads® MAX E. anti – *E. coli* O157; Catalog N° A10714 and A10715 - Version A DYNAL MPC®-M, Noruega) para separar las cepas de *E. coli*. Luego de la SIM, la suspensión se sembró en Agar Mac Conkey Sorbitol (Oxoid Cod: CM0115B) con cefixima telurito (Oxoid SRO172E) y suplemento MUG (Oxoid Cod: BRO071E) para seleccionar las colonias de *E. coli* que no fermentan el sorbitol y el MUG. Para confirmar el aislamiento de las colonias que no fermentaron al sorbitol y no metabolizaron al MUG, se las sometió a la prueba de aglutinación con látex (Latex Test Kit, Oxoid, Cod: DR0620). Una vez identificadas las cepas de *E. coli* O157:H7, se las sembró en medio Agar Mac Conkey (Britania Código B0211406), para proceder posteriormente a su congelamiento y conservación hasta la extracción de ADN, mediante la utilización de un kit comercial específico, (DNeasy® Blood & Tissue Handbook – Dneasy Blood & Tissue Kit). Para la caracterización de los genes que codifican los factores de virulencia, se utilizó una reacción de PCR Multiplex (Olsvik, Ø. et al. 1993; Paton, A. W. et al. 1998; Blanco, M. 2004 y M. Alvarez, S. et al. 2004).

Los registros promedio de las lluvias acumuladas y las temperaturas máxima, mínima y media, se tomaron 15 días previos a cada HMRA (Estación Meteorológica INTA Anguil, 2014/15), para relacionar la posible incidencia de las precipitaciones y las temperaturas con la excreción de *E. coli* O157:H7 y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

La relación entre la excreción de *E. coli* O157:H7, según la portación de los genes que codifican los factores de virulencia, *stx1*, *stx2*, con la temperatura (máxima, mínima y media) y las precipitaciones se modelaron con una regresión Poisson (Rodríguez, 2008).

La asociación entre variables de a pares se analizó usando pruebas de Chi cuadrado. En los análisis se usaron los procedimientos FREQ y GENMOD de SAS versión 9.2 (SAS Institute, 2008).

La relación del peso de los animales (livianos y pesados), los distintos tipos de alimentación, recría, pastoreo, terminación y la composición de la dieta, en los distintos

momentos del ensayo, con la excreción de *E. coli* O157:H7 y la presencia de los genes de virulencia se analizó mediante tablas de contingencia y pruebas de Chi cuadrado.

En los meses de agosto y setiembre de 2014; febrero y marzo de 2015 no se pudieron realizar las pruebas diagnósticas.

RESULTADOS

Durante la recría, la prevalencia de *E. coli* O157:H7 fue del 11,01% (13/118), 4,23% (5/118), 3,28% (4/118) y 1,69% (2/118), en marzo, abril, mayo y junio, respectivamente. Durante el pastoreo, la prevalencia fue del 0,84% en julio y 15,25% (18/118) en setiembre y noviembre. Mientras que en la etapa final disminuyó al 4,23% (5/118) en diciembre, al 0,85% (1/118) en enero y volvió a elevarse al 5,08% (6/118) en abril de 2015 (Tabla 1).

| Cría | | | | Pastoreo | | | Terminación | | |
|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|-------------|--------|--------|
| Mar-14 | Apr-14 | May-14 | Jun-14 | Jul-14 | Set-14 | Nov-14 | Dic-14 | Jan-14 | Apr-14 |
| 11.01 | 4.23 | 3.38 | 1.69 | 0.85 | 15.25 | 15.25 | 4.23 | 0.85 | 5.08 |

Tabla 1 Prevalencia mensual de excreción de *E. coli* O157:H7 en animales, a lo largo de los ciclos de ceba (cría, pastoreo y finalización) No se tomaron muestras en agosto y octubre de 2014 ni en febrero y marzo de 2015

El número de animales pesados que excretaban *E. coli* O157:H7 durante la recría fue superior al caso del de los animales livianos, mientras que, durante el periodo de pastoreo y la etapa de terminación, el número de excretadores fue similar en ambos grupos. Cuando se comparó la recría con la terminación, se comprobó que los livianos excretaron significativamente más *E. coli* O157:H7 durante la terminación, mientras que los animales pesados no presentaron diferencias durante el mismo periodo, Chi: 5,246 P: 0,5125 NS (Table 2).

| Peso | Recría | Pastoreo | Terminación | Totales |
|----------|--------|----------|-------------|---------|
| Livianos | 8 | 9 | 15 | 32 |
| Pesados | 15 | 10 | 16 | 41 |
| Totales | 23 | 19 | 31 | 73 |

Tabla 2 Animales excretadores de *E. coli* O157:H7 según peso y período. Los animales livianos mostraron un aumento en la excreción de *E. coli* O157:H7 durante la terminación, mientras que los animales pesados no presentaron diferencias. Chi: 5,246 P: 0,5125 NS

Posteriormente, se realizó un análisis del número de animales que excretaron *E. coli* O157:H7, según peso y período de engorde, de acuerdo al nivel de PB de la dieta (Tabla 3).

| | Recría | | | | Pastoreo | Terminación | | |
|----------|--------|------|------|-----|----------|-------------|-------|-----|
| | | | | | | | | |
| Corrales | 39 | 39 | 40 | 118 | 118 | 58 | 59 | 117 |
| Nivel PB | 9% | 13% | 18% | Tot | 9% | 9,5% | 13% | Tot |
| 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 3 Distribución de la excreción de *E. coli* O157:H7 de acuerdo etapa de engorde, nivel de proteína de la dieta y peso de los animales.

La relación de la excreción de *E. coli* O157:H7 según el nivel de PB de la dieta durante la recría (PB 9 – 13 – 18%), pastoreo (9% PB) y terminación (9,5 – 13% PB) no mostró diferencias significativas (Chi: 5,246 P: 0,5125 NS). Cuando se analiza solamente la dieta de recría que contiene 13% de PB, las diferencias observadas entre animales livianos y pesados, si bien son importantes (1/20 y 6/19 respectivamente), no son significativas.

No se observaron diferencias significativas entre la excreción de *E. coli* O157:H7 de los animales, ya fueran pesados o livianos y el porcentaje de PB en la dieta (9,5% y 13%) durante el período de terminación (Chi: 2,0219 P: 0,5678 NS; Tabla 4).

| Peso | Terminación | | |
|----------|-------------|--------|---------|
| | 9,5% PB | 13% PB | Totales |
| Livianos | 5/29 | 10/30 | 15/117 |
| Pesados | 8/29 | 8/29 | 16/117 |
| Totales | 13/58 | 18/59 | 31/117 |

Tabla 4 Excreción de *E. coli* O157:H7 en animales pesados o livianos según el porcentaje (9,5% y 13%) del contenido de PB en la dieta. No se observan diferencias significativas. Chi: 2,0219 P: 0,5678 NS

De las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas, el 100% portaban los genes para la expresión de *eae*. La presencia del gen que expresa *stx1* representó el 11% de las cepas detectadas, *stx2* el 33% y la de ambas, *stx1 - stx2*, el 56%. Es de destacar que *stx1* solo se detectó en el periodo de recría, mientras que *stx2* estuvo presente en 9 de 10 fechas de muestreo en forma constante, a lo largo del ensayo. La detección de ambos genes en combinación se dio en 7 de 10 muestreos y esta combinación fue particularmente elevada en setiembre y noviembre (Tabla 5).

| | Recría | | | | Pastoreo | | | Terminación | | | Totals | % |
|------------------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------|------|
| | mar-14 | apr-14 | may-14 | jun-14 | jul-14 | set-14 | nov-14 | dec-14 | jan-15 | apr-15 | | |
| <i>stx 1</i> | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 11% |
| <i>stx 2</i> | 4 | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 2 | 4 | 0 | 4 | 24 | 33% |
| <i>stx1-stx2</i> | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 15 | 16 | 1 | 1 | 2 | 41 | 56% |
| Total | 13 | 5 | 4 | 2 | 1 | 18 | 18 | 5 | 1 | 6 | 73 | 100% |
| % | 10,83 | 4,23 | 3,38 | 1,69 | 0,84 | 15,25 | 15,25 | 4,23 | 0,85 | 5,08 | | |

Tabla 5

Distribución anual de los genes *Stx*, presentes en las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de animales excretadores durante el ensayo.

Con respecto al análisis de la dieta, durante la recría, la presencia de *stx1-stx2* portadas por las cepas de *E. coli* O157:H7 excretadas por los terneros que consumieron la dieta con 9% de PB fue mayor respecto a los que consumieron la dieta con 13% y 18% de PB. Durante el pastoreo se destacó una elevada cantidad de novillitos que excretaban *E. coli* O157:H7 portadoras de *stx1-stx2*, a diferencia del periodo de terminación, en el cual fue bajo. Después del periodo de recría, no se vuelve a identificar la presencia de *stx1* y *stx2* se mantiene constante, con pocas variaciones, durante todo el ensayo.

Cuando se analizó (tabla 6) la relación de la presencia de *stx* con los periodos de recría, pastoreo y terminación, se encontraron diferencias entre los tres momentos del ensayo (Chi: 22,88; P: 0,000836).

| Toxina | Recría | Pastoreo | Terminación |
|------------------|--------|----------|-------------|
| <i>stx1</i> | 8 | 0 | 0 |
| <i>stx2</i> | 11 | 6 | 8 |
| <i>stx1-stx2</i> | 6 | 31 | 4 |

Tabla 6 El análisis de la relación de la presencia de las *Stx* durante recría, pastoreo y terminación arrojó diferencias entre los tres momentos del ensayo Chi: 22,88 P: 0,000836

El análisis comparativo de la presencia de las *stx* con el periodo de recría versus pastoreo y finalización indicó diferencias significativas (Chi 34,48; P<0,001), debido a que la *stx1* aparece solamente durante la recría y luego desaparece y a que la presencia de *stx1-stx2* es mucho más frecuente durante la etapa de pastoreo. Mientras que, al analizar las etapas de pastoreo y terminación se observó una presencia significativa de *stx1-stx2* durante el

pastoreo (Chi 11,30; P 0,02), con mayor la presencia de *stx2* durante la etapa de terminación.

En la tabla 7 se registran las temperaturas máximas, mínimas y medias, medidas 15 días previos a cada HMRA, para relacionarlas con la excreción de *E. coli* O157:H7 y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

| | 19-mar | 21-apr | 13-may | 10-jun | 7-jul | 7-aug | 10-set | 11-oct | 11-nov | 9-dec | 12-jan | 11-feb | 15-mar | 7-apr |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 13 | 5 | 4 | 2 | 1 | n/d | 18 | n/d | 18 | 5 | 1 | n/d | n/d | 6 |
| Max T°C | 23,7 | 19,2 | 18 | 13 | 9 | 9 | 15,6 | 24 | 26 | 26 | 32 | 32 | 30,5 | 26,5 |
| Mín T°C | 3 | 2,9 | 3 | -3 | -6 | -5 | -5 | 0,9 | 3,5 | 11 | 11 | 11 | 15 | 6,3 |
| Promedio | 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 |
| <i>stx1</i> | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | n/d | 0 | n/d | 0 | 0 | 0 | n/d | n/d | 0 |
| <i>stx2</i> | 4 | 2 | 3 | 1 | 1 | n/d | 3 | n/d | 2 | 4 | 0 | n/d | n/d | 4 |
| <i>stx1-stx2</i> | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | n/d | 15 | n/d | 16 | 1 | 1 | n/d | n/d | 2 |

Tabla 7 Registro de las temperaturas máximas, mínimas y medias, medidas 15 días previos a cada HMRA, para relacionarlas con la excreción mensual de *E. coli* O157:H7 y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

De marzo a julio de 2014, coincidentemente con la disminución de las temperaturas máximas, medias y mínimas, decrece la excreción de *E. coli* O17:H7. De agosto a noviembre, independientemente de las temperaturas mínimas, a medida que aumentan las temperaturas medias y máximas, incrementa la excreción. A partir de diciembre comienzan a aumentar las temperaturas, superando los 30°C de máxima en enero, febrero y marzo de 2015, mientras que las temperaturas medias y mínimas se estabilizan y comienzan a bajar a partir de marzo. Durante ese lapso de tiempo no se observa una variación importante en la excreción de *E. coli* O17:H7 (gráfico 1).

De marzo a julio de 2014, a medida que las temperaturas bajan, disminuye la presencia de *stx1*, *stx2* y *stx1 – stx2*. A partir de junio la *stx1* no se vuelve a identificar.

En setiembre y noviembre, independientemente de las temperaturas mínimas, con el aumento de las temperaturas medias y máximas, se incrementa la presencia de *stx1-stx2*. De diciembre 2014 a marzo de 2015, con temperaturas máximas, mínimas y medias elevadas, disminuye la *stx1-stx2*. En abril de 2015, coincidiendo con un descenso de las temperaturas, se detecta la presencia de *stx1-stx2* con niveles similares al mes de

diciembre. La presencia de *stx2* se mantiene en valores similares durante todo el ensayo, no manifestándose en enero de 2015.

En la tabla 8 se volcaron los registros promedio de las lluvias acumuladas, 15 días previos a las fechas de cada HMRA, para relacionar la posible incidencia de las precipitaciones con la excreción de *E. coli* O157:H7 y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

| | 19-mar | 21-abr | 13-may | 10-jun | 7-jul | 11-ago | 10-sep | 11-oct | 4-nov | 9-dic | 12-ene | 11-feb | 15-mar | 7-abr |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| Lluvia | 42 | 43,4 | 16 | 2 | 8 | 0 | 40,4 | 106,3 | 97,1 | 29 | 17 | 78 | 23 | 17,8 |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 13 | 5 | 4 | 2 | 1 | n/d | 18 | n/d | 18 | 5 | 1 | n/d | n/d | 6 |
| <i>stx1</i> | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | n/d | 0 | n/d | 0 | 0 | 0 | n/d | n/d | 0 |
| <i>stx2</i> | 4 | 2 | 3 | 1 | 1 | n/d | 3 | n/d | 2 | 4 | 0 | n/d | n/d | 4 |
| <i>stx1-stx2</i> | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | n/d | 15 | n/d | 16 | 1 | 1 | n/d | n/d | 2 |

Tabla 8

Registro de las precipitaciones medias acumuladas en mm, 15 días previos a cada HMRA, para relacionarlas con la excreción de *E. coli* O157:H7 y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia Shiga.

De marzo a junio de 2014, a medida que disminuyen los registros pluviométricos, se reduce la presencia de *stx1*, *stx2* y *stx1-stx2*. Durante julio, con registros de lluvia muy bajos, solo se detecta la presencia de *stx2*. Durante los meses de setiembre, octubre y noviembre se registraron abundantes precipitaciones, junto a un aumento moderado de la presencia de *stx2* y un notable incremento de *stx1-stx2*.

A partir de diciembre, con un menor registro de lluvias, disminuye la presencia de *stx1-stx2* y se mantiene la presencia de *stx2*. En enero de 2015, con bajo nivel de lluvias, se detectó solamente la presencia de *stx1-stx2*. En abril de 2015, también con bajas precipitaciones, se registró la presencia de *stx2* y una moderada presencia de *stx1-stx2*.

Cuando se analizaron las variables climáticas como factores predisponentes para la excreción de *E. coli* O157:H7, se encontró que los coeficientes de lluvias y temperatura media son positivos, lo que indica que cuando estas aumentan, también lo hace la excreción de *E. coli* O157:H7 (Tabla 9).

| Parametros | DF | Estimado | Error | X ² | Pr > X 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 |
| Promedio | 1 | 0.2266 | 0.0716 | 10.01 | 0.0016 |
| Escala | 0 | 1.0000 | 0.0000 | | |

Tabla 9 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 *E. coli* O157:H7.

Cuando se analizaron los datos correspondientes a los registros de las temperaturas y las precipitaciones, para determinar si pudieron haber influido sobre la presencia de los genes que codifican la expresión de *stx1*, no se encontró relación con ninguna de estas variables climáticas (Tabla 10).

| Parametros | DF | Estimado | Error | X ² | Pr > X 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 |
| Promedio | 1 | -0.0974 | 0.2633 | 0.14 | 0.7114 |
| Escala | 0 | 1.0000 | 0.0000 | | |

Tabla 11 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*

Tampoco se encontró relación entre las temperaturas y las precipitaciones, con la presencia de los genes que codifican la expresión de la *stx2*, usando la misma metodología estadística (Tabla 11).

| 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 |

| | | | | | |
|----------|---|--------|--------|-------|--------|
| Promedio | 1 | 0.1262 | 0.1393 | 0.82 | 0.3648 |
| Escala | 0 | 1.0000 | 0.0000 | 36.62 | <.0001 |

Tabla 11

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*.

Pero sí se encontró que los coeficientes para la lluvia y la temperatura media fueron positivos, indicando que, si aumenta la lluvia y/o la temperatura media, aumenta la presencia de los genes que expresan *stx1-stx2* (Tabla 12).

| Parametros | DF | Estimado | Error | χ^2 | Pr > χ^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 |
| Promedio | 1 | 0.5176 | 0.1608 | 10.36 | 0.0013 |

Tabla 12

Estimaciones de parámetros utilizando Máxima Verosimilitud se encontró que la relación entre temperaturas y precipitaciones con la presencia de *stx1-stx2* es significativa.

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

DISCUSIÓN

En Escocia, Chase-Topping, M. et al., 2008, demostraron que el 20% de los animales de las granjas muestreadas estaban infectados con *E. coli* O157:H7. Blanco, M. et al. 2004, indicaron que, en las granjas españolas examinadas, el 37% de los terneros y el 27% de las vacas estaban contaminadas con *E. coli* O157:H7. Laegreid, W. et al., 1999 encontraron en rodeos analizados en Canadá, que el 83% de los terneros eran excretores de *E. coli* O157:H7 antes de llegar a los corrales de engorde.

En Argentina, en un análisis de frigoríficos, Del Castillo, L.L. 2014 observó que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en terneros era del 10,5 %, del 8,5% en vaquillonas, del 5,1% en novillitos, 3,5% en novillos y 1,5 % en vacas.

Sanderson, M. W. et al, 2006, encontró una prevalencia de *E. coli* O157:H7 del 36,7%, 5 semanas después del arribo de los terneros al feedlot; y LeJeune J. T. et al, 2003, informa que, en un feedlot de Canadá, la prevalencia era del 7,4% al destete y del 15%, 7 días después del arribo de los animales a las instalaciones.

En nuestro trabajo, la prevalencia de *E. coli* O157:H7, al ingresar los terneros a los corrales (marzo 2014), fue del 10,83%. Durante abril, mayo y junio disminuyó al 4,23%, 3,28% y 1,69% respectivamente. En julio, durante el pastoreo, fue del 0,84% y en setiembre y noviembre, cuando alcanzaron la categoría de novillitos, fue del 15,25%. En la etapa final, en diciembre de 2015, fue del 4,23%, en enero fue del 0,85% y en abril del 5,08%.

En rodeos de carne de Canadá, Le Jeune, J. T. et al., 2007 encontraron que los terneros excretaban más *E. coli* O157:H7 que los adultos; estableciendo que los animales con pesos inferiores a 317 kg mostraron mayor índice de excreción, asociando el peso y la edad como factores desencadenantes.

En un estudio longitudinal realizado por Williams, K. J., et al. 2015, en Australia, se muestrearon semanalmente 52 vaquillonas lecheras que pastoreaban pasturas, suplementadas con heno y pellets con alto contenido proteico, encontrando que la condición corporal y peso de los animales analizados, estaba positivamente asociada con el incremento de la excreción de *E. coli* O157.

En este trabajo se observó que la excreción de *E. coli* O157:H7 en los animales pesados, durante la recría, fue superior a la de los livianos, mientras que, durante el pastoreo y la etapa de terminación, el número de excretos livianos y pesados tienen valores similares. Pero al comparar a la recría con la terminación, los animales livianos al inicio, excretaron significativamente más durante la terminación, mientras que los animales pesados no presentan diferencias significativas.

En el estudio longitudinal realizado en Canadá por Hallewell, J. et al., 2016, con terneros destetados, al ingreso al feedlot, a los 30 y a los 135 días de encierro, encontraron que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 aumentaba del 66,7 al 90%, a lo largo del tiempo, mientras consumían una dieta concentrada.

Kuduva, I. T. et al, 1996, informa que si bien, los factores que desencadenan la excreción de *E. coli* O157:H7 en los terneros que ingresan al feedlot, no están bien determinados, afirma que el estrés nutricional juega un papel predisponente para la excreción, la contaminación del ambiente y el posterior contagio de otros animales.

En rodeos de carne de Canadá, Le Jeune, J. T. et al., 2007 encontraron que el aumento de grano en la dieta durante el primer mes de encierre, sensibilizó a los animales a la infección, incrementando la excreción de *E. coli* O157:H7. Cuando la concentración de

grano se niveló, notaron que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 se estabilizó en un nivel más bajo.

El trabajo comparativo realizado por Berg, J.; et al, 2004, determinó una prevalencia de *E. coli* O157:H7 del 2,4% en novillos alimentados con grano de cebada y del 1,3% entre los animales alimentados con grano de maíz, determinando que la diferencia pudo deberse al Ph de la materia fecal, que en el caso de la dieta de maíz era más bajo.

Cernicchiaro, N. et. al., 2010, evaluaron los efectos del contenido de humedad en la ración (maíz húmedo y maíz entero seco), con la utilización de dos núcleos diferentes, sobre la excreción de *E. coli* O157: H7 en 168 novillos encerrados en 24 corrales. Los que consumieron maíz entero presentaron una mayor prevalencia que los alimentados con maíz húmedo, concluyendo que la diferencia en la excreción obedeció al tipo de aditivo utilizado para la formulación de las raciones y no al tipo de maíz.

Meichtri et al., 2004, en un matadero de Argentina, 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 *E. coli* O157:H7 en el 39% de los animales analizados.

En este trabajo se determinó que el nivel de PB en las dietas a los que fueron sometidos los terneros en los corrales, de acuerdo a los pesos (livianos y pesados), no influyó sobre la excreción de *E. coli* O157:H7. Pero, cuando se analizó a los animales que consumieron la dieta de recría que contenía el 9% de PB, se encontraron valores más elevados de la presencia conjunta de *stx1* - *stx2*, con respecto a los que consumen la dieta con 13% y con 18% de PB.

Jacob, M. et. al. 2009, reportaron que la composición de la dieta tiene incidencia en la excreción de *E. coli* O157:H7 en los bovinos, pero que los mecanismos 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, concluyeron que los resultados de los estudios son muchas veces contradictorios o no repetibles, como consecuencia 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.

Mercado, E., 2006 en un trabajo sobre el control de la excreción de *E. coli* O157:H7 en bovinos de carne, informa que cuando se pasó abruptamente de una dieta basada en grano de maíz a pastoreo de forraje, se observó una disminución de animales excretando *E. coli* O157:H7.

En nuestro trabajo se observó, al contrario de lo informado por Mercado, E., 2006 y otros autores, que cuando los animales alimentados con la dieta basada en granos, pasaron a pastoreo a campo, aumentó la cantidad de animales excretando *E. coli* O157:H7.

Terrance, M. A. et al., 2009, encontró en Kansas, USA, una prevalencia de *E. coli* O157:H7 del 5% en terneros, previo a la entrada a un feedlot, destetados en setiembre (otoño), provenientes de pasturas, determinando que la influencia estacional podría haber actuado como factor predisponente para la excreción.

La revisión sistémica realizada por Ekong, P. S., et al. 2015, estableció una prevalencia estival de *E. coli* O157:H7 del 10,68% en animales jóvenes, 4,65% en adultos y 1,79% en vacas lecheras y una prevalencia invernal del 9,17%, 4,21%, y 0,36% respectivamente

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

Los resultados de Fink, R. C. et al. 2018, en un estudio longitudinal realizado sobre 4138 novillos y vaquillonas, indican una mayor prevalencia estacional de *E. coli* O157 durante otoño.

El estudio longitudinal realizado por Smith R.P. et al. 2009 en Gran Bretaña sobre la excreción de *E. coli* O157:H7 en terneros de carne, detectó picos de prevalencia en primavera y el verano, destacando que los patrones estacionales de excreción no guardaban relación con reportes de otros países europeos.

En Argentina, Fernandez, D. y Padola, N. 2012, observaron una mayor prevalencia de *E. coli* O157:H7 en terneros de tambo en épocas cálidas. A su vez Van Donkersgoed, J. et al. 2001, en Canadá, encontraron que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 fue mayor durante los meses de verano y otoño, siendo menores en los meses de invierno. LeJeune, J. T., et al 2004, Edrington, T. et al. 2006, Hussein, H. S. et al. 2007, Ekong, P. S. et al. 2015 reportan picos de prevalencia de *E. coli* O157:H7 en verano, como consecuencia de la mayor cantidad de horas luz diurna.

Por otro lado, en Escocia, Chase-Topping, M. et al, 2008, indicaron que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 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 la prevalencia de *E. coli* O157:H7 disminuye durante el otoño, es muy baja en invierno, particularmente alta en la primavera, volviendo a disminuir durante el verano.

Respecto a las diferencias estacionales en la prevalencia de *E. coli* O157:H7, Fernández, D. et al, 2009, recomienda ser cuidadosos a la hora de hacer comparaciones con la prevalencia registrada en otros países e incluso dentro de un mismo país, ya que se pueden observar variaciones entre estudios, debido a múltiples factores, como el número y categoría de animales muestreados, el método de muestreo, metodología empleada para el procesamiento de las muestras, la estación del año, factores climáticos, nutricionales y de manejo.

Los reportes de Money, P. et al. 2010 en Escocia, indicaron que la excreción de *E. coli* O157:H7 tenía una relación con las precipitaciones, coincidiendo con el estudio longitudinal de Williams, K. J. et al., 2015, en Australia, sobre 52 vaquillonas lecheras, en donde las temperaturas máximas, las precipitaciones y la humedad relativa, estaban también asociadas con la excreción y a su vez había una relación entre las precipitaciones y la presencia de animales súper excretores.

En este trabajo 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.

En un seguimiento sobre 244 bovinos de carne en pastoreo, pertenecientes a un mismo rodeo de la región Pampeana, realizado por Parma et al., 2000, determinaron la presencia de *E. coli* O157:H7 en 20/26 terneros y en 1/39 bovinos adultos y en todos los casos se encontró la presencia del gen *eae* de la región constante de Intimina.

Blanco, M. et al., 2000, en España, comunicaron que todas las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas en terneros, portaban el gen para expresar al *stx1* y que el gen *stx2* predominaba en animales adultos, y todas las cepas portaban al gen *eae*.

Coincidentemente, en el presente trabajo se encontró que el 100% de las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas, portaban el gen *eae* de la región constante de Intimina.

Blanco, M. et al., 2010, reportaron que, sobre 514 aislamientos de bovinos con y sin diarrea, el 20% de *E. coli* O157:H7 eran portadoras del gen *stx1*; el 54% portaban el gen

para *stx2* y el 26% portaban ambos genes *stx1 - stx2*. En la Argentina, Padola, N. et al, 2010, informaron prevalencias del 9% para el gen *stx1*; 20% para la presencia del gen *stx2* y 4% para la presencia conjunta de *stx1 - stx2*, sobre 126 terneros y 118 vacas lecheras muestreados, indicando que los hallazgos del gen *stx2*, son más comunes en animales de mayor edad.

Gunn, I. J. et al., 2007; Blanco, M. et al., 2010; Masana, M. O. et al., 2010; citan que la prevalencia de los genes *stx2* y *stx1 - stx2*, portados por *E. coli* 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.

LeJeune J. T. et al, 2004, en un feedlot de Canadá, identificaron los genes para la codificación de la *stx1* en el 0,43% de las muestras, la *stx2* en el 16% y para la expresión conjunta de *stx1 - stx2* en el 83%.

Fernández, D. y Padola, N., 2012, en un seguimiento estacional del comportamiento de la *E. coli* O157:H7 y los factores de virulencia, en tambos de Argentina, reportaron un aumento de las cepas portadoras de *stx1 - stx2* y una disminución de la *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 el presente trabajo determinaron, que la presencia de *stx1* se verificó solamente al inicio del ensayo en animales jóvenes (11%). La expresión de la *stx2* se detectó en el 33% de las muestras, manifestándose con poca variación a lo largo de todo el ensayo. La expresión conjunta de *stx1 - stx2* (56%) fue irregular a lo largo del periodo del estudio, destacándose, durante la primavera, su presencia en un elevado número de muestras.

Los reportes de Padola, N.; et al. 2004; Edrington, T. S. et al., 2006, Fernández, D., et al. 2012 y Ekong, P. S. et al., 2015, concuerdan en que la excreción de *E. coli* O157:H7 es mayor durante primavera-verano y menor en invierno, pero en ninguno de los trabajos se relaciona la incidencia de la temperatura y las precipitaciones con la excreción. Coincidentemente LeJeune, J. T. et al.; 2004; determinaron una mayor prevalencia de *E. coli* O157:H7 durante el verano, sin reportar ninguna correlación entre la prevalencia encontrada y los datos meteorológicos registrados semanas anteriores a cada fecha de muestreo.

Contrariamente, los reportes de Money, P. et al. 2010 en Escocia y de Williams, K. J. et al., 2015, en Australia, indicaron que la excreción de *E. coli* O157:H7 tenía relación con las precipitaciones, las temperaturas máximas y la humedad relativa y a su vez había una relación entre las precipitaciones y la presencia de animales súper excretores.

En este trabajo 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 genes de virulencia presentes en las *E. coli* O157:H7, no se encontró relación entre la lluvia y las temperaturas con la presencia de *stx1* y *stx2*, pero sí influyeron significativamente sobre la expresión conjunta de la *stx1 - stx2*.

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 *E. coli* O157:H7 y la presencia de los genes de virulencia Shiga.

CONCLUSIONES

La excreción de *E. coli* O157:H7 en el último periodo de engorde está asociada al peso de los animales, determinándose que excreción en los animales livianos que ingresaron al engorde, fue significativamente superior a la de los animales pesados. Dato a tener en cuenta para aumentar las medidas de buenas prácticas de manufactura en las plantas frigoríficas, cuando remiten a faena esta categoría de animales.

Las temperaturas y las precipitaciones de primavera actuaron como factores predisponentes para la excreción *E. coli* O157:H7 y la presencia de *stx1 - stx2*.

Estudios transversales y longitudinales, para estimar la influencia de los factores de riesgo en la excreción de *E. coli* O157:H7 en distintos rodeos, en condiciones de pastoreo y de encierre, serán de importancia para avanzar en la adopción de medidas preventivas, para disminuir su prevalencia en los bovinos destinados a faena.

La excreción de *E. coli* O157:H7 en el último periodo de engorde, de los animales livianos que ingresaron al engorde, fue significativamente superior a la de los animales pesados.

El cambio la dieta, basada en granos, por un pastoreo a campo, elevó el número de animales excretores.

Las temperaturas y las precipitaciones, actuaron como factores predisponentes para la excreción *E. coli* O157:H7 y la presencia de *stx*.

Estudios transversales y longitudinales, para estimar la influencia de los factores de riesgo en la excreción de *E. coli* O157:H7 en distintos rodeos, en condiciones de pastoreo y de encierre, serán de importancia para avanzar en la adopción de medidas preventivas, para disminuir su prevalencia en los bovinos destinados a faena.

BIBLIOGRAFIA

- Ahlstrom, C.; Muellner, P.; Lammers, G.; Jones, M.; Octavia, S.; Lan, L.; Heller, J.; 2017, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Shedding Dynamics in an Australian Beef Herd. *Vet Sci.*, 4: 200
- Almada, J.; Estrella, P.; Ottavianoni, L.; Pérez, S.; Rodríguez, E.; Chinen, I.; Carbonari, C.; Deza, N.; Miliwebsky, E.; Baschbier, A.; Rivas, M.; 2009, 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.
- Berg, J.; McAllister, T.; Bach, S.; Stilborn, R.; Hancock, D.; LeJeune, J., 2004, *Escherichia coli* O157: H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley-or corn-based finishing diets. *Journal of Food Protection.* 67(4): 666-671.
- Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M. P.; González, E. A.; Bernárdez, M. I.; Blanco, J.; Serotypes, 2004, 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:* 645–651.
- Borie, C.; Monreal, Z.; Guerrero, P.; Snachez, M. L.; Martínez, J.; Arellano, C.; Prado, V., 1997, 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; Vol. 29 N° 2.

Cernicchiaro, N.; Pearl, D. L.; McEwen, S. A.; Zerby, H. N.; Fluharty, F. L., Loerch, S. C.; LeJeune, J. T., 2010, 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*, 7(9): 1071-1081.

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*; 6(12): 904-912.

Del Castillo, L. L., 2014, 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, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata.

Edrington, T.; Callaway, T. R.; Ives, S. E.; Engler, M. J.; Loofer, M. L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J., 2006, Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3(4): 413 – 421.

Ekong, P. S.; Sanderson, M. W.; Cernicchiaro, N., 2015, 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*; 121(1): 74-85.

Fernández, D., Rodríguez, E. M., Arroyo, G. H., Padola, N. L., Parma, A. F. 2009. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J. Appl Microbiol* 106:1260-7

Fernández, D.; Padola, N., 2012, *Escherichia coli* verotoxigénico: varias cuestiones... y los tambos también. *Revista Argentina de Microbiología*. 44: 312-323.

Fink, R. C., Popowski, J. M., Anderson, J. E., Tran, J. L., Sudha Kalyanikutty, Grant I. Crawford, G. I., DiCostanzo, A., Cox, R. B., Diez-Gonzalez, F. 2018. Impact of distillers grain solids (DGS) and seasonality on the prevalence of *Escherichia coli* O157 at an abattoir in the U. S. Upper Midwest. *Journal of Applied Animal Research*, VOL. 46, NO. 1, 237–241

Gunn, G.J., McKendrick, I.J., Ternent, H.E., Thomson-Carter, F., Foster, G., Synge, B.A., 2007. An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin

- producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *Vet. J.* 174, 554–464 564. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.024.
- Hussein, H. S., 2007, Prevalence and pathogenicity of shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*; 85(3):63 – 72.
- Jacob, M. E.; Callaway, T. R.; Nagaraja, T. G., 2009, Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli* O157 colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease.* 6(7): 785-792.
- [LeJeune, J. T.](#); [Besser, T. E.](#), [Rice, D. H.](#); [Berg, J. L.](#); [Stilborn, R. P.](#); [Hancock, D. D.](#); 2004, 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, [Appl Environ Microbiol](#); 70(1): 377–384
- Le Jeune, J. T.; Wetzel, A. N., 2007, Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Journal of Animal Science*: 85(13_suppl): E 73 – E 80.
- Laegreid, W. W.; Elder, R. O.; Keen, J. E., 1999, Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in range beef calves at weaning. *Epidemiology and Infection*; 123(02): 291-298.
- Leotta, G. A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I. C.; Mottez, M.; Ferrer, M.; Marey.; E.; Rivas, M., 2005, Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga. *Revista Argentina de Microbiología*, 37: 1 – 10.
- M. Alvarez, S.; P. Roth, E., 2004, La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas clínicas*; 22(3): pp 182 – 192.
- Masana, M.O., Leotta, G.A., Del Castillo, L.L., D’Astek, B.A., Palladino, P.M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodríguez, H.R., Rivas, M., 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.* 73, 649–56.
- Meichtri, L.; Miliwesbsky, E.; Gioffré, A.; Chinen, I.; Baschkier, A.; Chilemi, G.; Guth, B.; Masana, M.; Cataldi, A.; Rodríguez, H. R.; Rivas, 2004, M. Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International Journal of Food Microbiology*; 96(2): 189 -198.
- Mercado, E., 2006, Control de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino. *Medicina. Buenos Aires*; 66 (Supl. III): 33-36
- Mercado, M.; 2007, Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina?, *Revista Argentina de Microbiología*, 39: 191-192

Money, P.; Kelly, A. F.; Gould, S. W.; Denholm – Price, J.; Trelfall, E. J.; Fielder, M. D., 2010, Cattle, weather and water, mapping *Escherichia coli* O157:H7 infection in England and Scotland. *Environ. Microbiol.*, 12(10) 2633-2644

[Nobili, G.](#); [Franconieri, I.](#); [La Bella G.](#); [Basanisi, M. G.](#); [La Salandra G.](#), 2017, Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from raw beef in southern Italy. [Int J Food Microbiol.](#); 257:201-205

Olsvik, Ø.; & Strockbine, N. A., 1993, PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*, 271-276.

Olvera, A.; Signorini, M.; Tarabla, H., 2010, *Escherichia coli* verotoxigénica: modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas en Argentina. *Revista Panamericana de salud Pública*; 27(6): 403 – 413

Padola, N.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverría, A.; Arroyo, G. H.; Usera, M.; Parma, A. E.; 2004, Serotypes and virulence genes of bovine shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina; *Veterinary Microbiology*; 100(1): 3 – 9.

Parma, A. E.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Viñas, M. R.; Blanco, M.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I.; 2010, Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *European Journal of Epidemiology*; 16: 757-762.

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.

Polifroni, R.; Etcheverría, A. I.; Sanz, M. E.; Cepeda, R. E.; Krüger, A.; Lucchesi, P. M.; Padola, N. L., 2012, Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the environment of a dairy farm. *Current microbiology*. 65(3): 337-343.

Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M.; Swerdlow, D. L., 2005, Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States. 1982–2002.

Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G. 2006. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del Agente Etiológico, Reservorios y Vías de Transmisión. Servicio de Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires. *Medicina*. Buenos Aires. 66 (Supl. III): 27-32.

Rodriguez, G. 2007. Poisson models for count data. Lecture Notes on Generalized Linear Models. <http://data.princeton.edu/wws509/notes>

Sanderson, M. W.; Sargeant, J. M.; Shi, X.; Nagaraja, T. G.; Zurek, L.; Alam, M. J. 2006. Longitudinal emergence and distribution of *Escherichia coli* O157 genotypes in a beef feedlot. *Applied and environmental microbiology*. 72(12): 7614-7619.

Smith, R. P.; Paiba, G. A.; Ellis-Iversen, J. 2010. Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Research in Veterinary Science*. 88: 411-414.

Sparo, M. D.; Schell, C. M. 2011. Bacterias zoonóticas y alimentos. Asociación Argentina de Zoonosis. *Temas de Zoonosis V*; Capitulo 43: 379 – 386.

Stenkamp-Strahm, C.; McConnel, C.; Hyatt, D. R.; Magnuson, R.; Tenneson, P.; Linke, L. 2017. Prevalence of *Escherichia coli* O157 Shedding in Preweaned Calves on Colorado Dairies. *Journal of Food Protection*: Vol. 80, No. 6, pp. 990-993.

Terrance, M. A.; Keen, J. E.; Bosilevac, J. M.; Brichta-Harhay, D. M.; Kalchayanand, N.; Shckelford, S. T.; Wheeler, T. L. 2009. 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*; 75(20): 6515 – 6523.

Van Donkersgoed, J.; Berg, J.; Potter, A.; Hancock, D.; Besser, T.; Klashinsky, S. 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *The Canadian Veterinary Journal*; 42(9), 714 – 720.

Williams, K. J.; Ward, P. M.; Dungyel, O. P.; Hall, E. J. 2015. Risk factors for *Escherichia coli* O157 shedding and super-shedding by dairy heifers at pasture. *Epidemiol. Infect.* Apr:143(5):1004 - 15