



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD ALIMENTARIA EN EL
PRIMER ESLABÓN DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN
DE CARNE, EN EL URUGUAY**

FEDERICO FERNÁNDEZ FUENTES

TESIS DE MAESTRIA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2006**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD ALIMENTARIA EN EL
PRIMER ESLABÓN DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN
DE CARNE, EN EL URUGUAY**

FEDERICO FERNÁNDEZ FUENTES

Andrés D. Gil; DV, MS, PhD
Director de Tesis

Ricardo Méndez; DMV, MS
Co-director

2006

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Sergio J. Duffy MV, MSc, PhD
Director del Instituto de Patobiología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
INTA – Castelar - Argentina

Jacqueline Maisonnave, DMV, MSc, MPVM, PhD
Instituto Patobiología, Depto. de Ciencias Microbiológicas
Facultad de Veterinaria – Universidad de la República. Uruguay

Gabriela Algorta; MD
Instituto de Higiene, Depto. de Bacteriología y Virología
Instituto de Higiene
Facultad de Medicina - Universidad de la República. Uruguay

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las Instituciones que colaboraron en este estudio, como lo fueron el INIA, con la aprobación y financiamiento del proyecto y a las Divisiones de Sanidad Animal y de Laboratorios Veterinarios del MGAP, autoridades y funcionarios que realizaron su invaluable tarea de modo absolutamente eficaz.

También se extiende el agradecimiento a las otras instituciones participantes: Facultad de Veterinaria, específicamente a los integrantes del Departamento de Bioestadística; al Center for Epidemiology and Animal Health, en la persona de David Dargatz ; al Colorado State University, en las personas de Mo Salman y Doreene Hyatt; al Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, Dres. Gabriela Algorta y Gustavo Varela ; y a las asociaciones de productores Sociedad Criadores Hereford del Uruguay, Sociedad de Fomento Rural de Colonia Valdense y Asociación Uruguaya de Productores de Carne Intensiva Natural.

Agradezco a los orientadores de mi tesis, el Dr. Ricardo Méndez Algorta y especialmente al Dr. Andrés Gil, por su dedicación, paciencia y generosidad durante estos años.

Asimismo deseo extender mi reconocimiento a mis compañeros de tareas, especialmente al Dr. Fernando Etchegaray, quien durante largo tiempo brindó generosamente su respaldo a mi trabajo viendo recargadas sus actividades en más de una oportunidad a consecuencia de ello.

A mi familia deseo brindarle mi especial agradecimiento ya que constituyó el soporte indispensable en estos años y resignaron mucho para que yo pudiese completar esta etapa de mi carrera profesional.

Evaluación de la Inocuidad Alimentaria en el Primer Eslabón de la Cadena de Producción de Carne, en el Uruguay

INDICE

PREFACIO	iii
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
OBJETIVOS	5
BIBLIOGRAFÍA	5
CAPÍTULO I: <i>ESCHERICHIA COLI</i>	8
Clasificación	8
Propiedades	9
Epidemiología	10
Clínica	11
Patogenia	11
Diagnóstico	12
Control	12
Bibliografía	13
PREVALENCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 EN LA GANADERÍA DEL URUGUAY	17
Introducción	17
Materiales y Métodos	19
Resultados	23
Discusión	27
Conclusiones	31
Bibliografía	32
CAPÍTULO II: SALMONELOSIS	39
Clasificación	39
Patogenia y enfermedad	39
Impacto de <i>Salmonella</i>	40
Epidemiología	40
Incidencia en el hombre y los animales	42
Medidas de control	43
Bibliografía	44
PREVALENCIA DE <i>SALMONELLA</i> Spp EN LA GANADERIA PARA CARNE DEL URUGUAY	46
Introducción	46
Materiales y Métodos	48
Resultados	51
Discusión	55
Conclusiones	58
Bibliografía	59

CAPÍTULO III: RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	63
Resistencia antimicrobiana	563
Bibliografía	67
SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTI-MICROBIANOS EN LA GANADERIA PARA CARNE DEL URUGUAY	70
Introducción	70
Materiales y Métodos	72
Resultados	76
Discusión	87
Conclusiones	89
Bibliografía	90
CONCLUSIONES FINALES	93

PREFACIO

El contenido del presente trabajo está organizado en diferentes capítulos, según los temas que se abarcan, de acuerdo al estudio desarrollado. En el capítulo referido a *Escherichia coli* se hace referencia a su clasificación, propiedades y características clínicas y epidemiológicas, para luego presentar el estudio en formato IMRD: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión y Conclusiones. El capítulo dedicado a *Salmonella* está desglosado en apartados referidos a su clasificación, la patogenia y datos clínicos, los impactos que produce y finalmente para la epidemiología e incidencia en el hombre y los animales. Después se presenta el estudio en formato IMRD. El último capítulo está dedicado a la Resistencia Antimicrobiana, presentando datos introductorios para luego mostrar el trabajo según el formato IMRD

RESUMEN

La preservación de la inocuidad de los alimentos es un problema global de creciente relevancia donde las enfermedades transmitidas por alimentos, ocasionan importantes pérdidas económicas y sociales. Se realizó la primera evaluación en el ámbito de los establecimientos productores de ganado para carne del Uruguay, de forma de identificar si *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 están presentes, cual es su prevalencia y cual es el grado de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de *E. coli* como bacteria de la flora intestinal.

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado de establecimientos con novillos próximos a faena, los que estaban en los estratos de: pasturas, engorde a corral y lechería. Se muestrearon 133 establecimientos seleccionándose hasta 50 novillos en cada uno con lo que se totalizaron 6.000 muestras. La proyección, a nivel de población, indica que se puede esperar aislar *Salmonella* spp. en $5\% \pm 2\%$ y *Escherichia coli* O 157:H7 en $0,05\% \pm 0,05\%$ de los establecimientos. La prevalencia hallada en la población de novillos alcanzó el $0,13\% \pm 0,07$ y $0,008\% \pm 0,008\%$, respectivamente. Las bacterias indicadoras mostraron niveles de susceptibilidad mayores al 90%, excepto estreptomocina (80%). Las resistencias múltiples están en el entorno del 30%. Se concluye que Uruguay tiene una ganadería de carne donde la presencia de los agentes estudiados tiene una presencia muy baja y existe una alta susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Estas características deben de llegar al consumidor para que puedan apreciar las ventajas comparativas que la producción de carne que ofrece el Uruguay.

SUMMARY

Preserving Food Safety is a global problem of growing concern. Disease related with food consumption is a Public Health problem, which causes important economic and social losses. This is the first evaluation carried out in relation to Uruguayan's beef cattle operations. The main objective was to identify the presence and estimate prevalence of *Salmonella* spp, *E. coli* O157:H7, and antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* in the beef cattle. A stratified random sampling of premises was carried out; strata were operation on pastures, feedlots, and dairy farms. A total number of 133 beef cattle operations were selected and until 50 steers' faecal samples within each farm (6.000 faecal samples total) . Estimation for the isolation of *Salmonella* spp. is $5\% \pm 2\%$ and for *Escherichia coli* O157:H7 is $0,05\% \pm 0,05\%$ on farms population level. Steers prevalence for this bacterial agents reached $0,13\% \pm 0,07$ and $0,008\% \pm 0,008\%$, respectively. Indicator bacteria showed levels of susceptibility up to 90%, with exceptions: streptomycin susceptibility was around 80%. Phenotypic analysis shows that the multiple resistances are nearly 30%. In conclusion, Uruguay beef cattle operations have very low risk for the two studied agents and a high susceptibility to antimicrobial agents. These food safety characteristics of the Uruguayan's beef production should be known by the consumer, who will appreciate more Uruguayan meat.

Evaluación de la Inocuidad Alimentaria en el Primer Eslabón de la Cadena de Producción de Carne, en el Uruguay

INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos se ha constituido en un problema de la vida cotidiana y la mejora en la calidad de los productos que componen la dieta, es un desafío para los próximos años. Como componente de los regímenes alimentarios, los productos de origen animal constituyen una parte significativa, y dentro de ellos la carne vacuna es uno de sus principales ingredientes.

La importancia de este tema tiene dos enfoques diferentes en el Uruguay. Uno de ellos se refiere a la importancia que adquieren las enfermedades de transmisión alimentarias (ETA) para la salud humana, máxime teniendo en cuenta que existe una tendencia ascendente en el número de brotes denunciados (Savio & Lindner, 2002). El otro motivo de preocupación frente al tema está asociado a la trascendencia que la cadena cárnica tiene para nuestro país, como generadora de recursos económicos (Peyrou & Ilundain, 2005), y los parámetros de calidad del producto final. Se define como ETA al “síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población” (INPPAZ/OPS, 1993). El agente más frecuentemente responsabilizado como agente de los brotes es *Salmonella*, apareciendo como agente etiológico en 1995 y permaneciendo en los años subsiguientes (Savio & Lindner, 2002). Esta es considerada como un patógeno reemergente, ya que está documentada en Uruguay desde 1934 de casos aislados en lactantes internados en el Hospital Pereira Rossell. Precisamente la presencia de *Salmonella* es uno de los motivos de este estudio. En Uruguay funciona un Programa Nacional Integrado de Alimentos interinstitucional, cuyo eje central es proteger al consumidor uruguayo, y promover la exportación de productos alimenticios garantizando su calidad e inocuidad, para alcanzar el crecimiento y desarrollo económico. Al respecto existe una serie de reglamentaciones, conciliables con las del Codex Alimentarius FAO/OMS, aunque no hay una Ley nacional de alimentos (Anchieri, 2000). En la región, las ETA están entre las primeras 5 causas de muerte en niños menores de 5 años, y por tal motivo la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en su Plan de Acción promovió la elaboración de la “Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por los alimentos y la investigación de brotes de toxoinfecciones alimentarias” (Guiaveta) buscando promover el desarrollo y perfeccionamiento de los Sistemas Nacionales de Vigilancia Epidemiológica de las ETA (INPPAZ/OPS, 1993). La ocurrencia de ETA en la región está en incremento debido a varios factores, tales como el aumento de la población, aparición de grupos poblacionales vulnerables, acelerada urbanización, incremento del turismo e intenso comercio internacional de alimentos (Lindner y Savio, 2002). En este marco es que se inicia en 1995 la implementación del Sistema de Vigilancia de ETA (VETA) en el Uruguay, con integración multiinstitucional, integrándose el país al Sistema de Información Regional, Vigilancia Epidemiológica (SIRVE-ETA) (MSP, 1999). En otro ámbito el Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA), realizó una investigación con el propósito de identificar los Asuntos Emergentes en el hemisferio, levantando una consulta en 24 países miembros (IICA, 2000). De su

análisis surge como uno de los principales Asuntos Emergentes detectados el desarrollo de resistencia a los antibióticos, antiparasitarios y acaricidas, como producto de la evolución de los agentes infecciosos y plagas. Una de las recomendaciones emitidas encuentra la necesidad de evaluar constantemente la preocupación del consumidor por la seguridad e inocuidad alimentaria, las que probablemente guiarán las prioridades públicas y de comercio en la próxima década; el enfoque de la “granja a la mesa” será seguramente cada vez más universal en el continente americano.

El alimento contaminado mantiene las características organolépticas, por lo que se dificulta su hallazgo (Tauxe, 1997). Tradicionalmente las ETA estaban relacionadas a carnes mal cocidas o leche cruda, pero hoy en día se agregan productos que antes se consideraban seguros, como el huevo, las carnes procesadas, bebidas ácidas como yogurt y sidra, entre muchos otros. Precisamente estos nuevos vehículos comparten algunas características entre las cuales se debe poner énfasis en el hecho de que la contaminación ocurre en las etapas más tempranas del proceso productivo (Tauxe, 1997). Asimismo, también ha cambiado el escenario de los brotes, que actualmente son extendidos en el espacio y producidos por contaminaciones de bajo nivel. Esto dificulta la investigación y control de los mismos, y ha obligado a cambios en los sistemas de vigilancia epidemiológica como el uso de centinelas y monitoreos de rutina a diferentes niveles, así como a la formación de “redes” que involucran diferentes países armonizando procedimientos. Este cambio en el “paradigma” de las ETA ha llevado a cambios en las estrategias que impidan demorar la identificación del agente causal y su origen, para impedir su rápida difusión (Majkowski, 1997)

En los países desarrollados, una serie de cambios en los hábitos sociales ha favorecido el aumento de la frecuencia de las ETA, como lo son el elevado número de mujeres que ingresaron al mercado laboral, la menor dedicación en la preparación de alimentos, y el incremento de hogares con un solo jefe de familia (Collins, 1997). Las comidas fuera de casa muestran una tendencia creciente, a la vez que un porcentaje elevado de los brotes de ETA se producen en restaurantes. En Estados Unidos más de la mitad de los brotes de *Salmonella* ocurren en restaurantes, y en Uruguay menos de la mitad suceden en el hogar (Savio & Lindner, 2002). También en países desarrollados, los hábitos culinarios en el hogar han cambiado, dedicando menos tiempo en la preparación de las comidas, muchas de las cuales se basan en alimentos precocinados, constatándose una disminución en las habilidades y medidas higiénicas adoptadas (IOM/NRC, 1998). La educación para la salud en Estados Unidos a nivel secundario prioriza problema de actualidad como la obesidad y el Sida, descuidando lo relacionado a la inocuidad alimentaria (Alterkruse et al. 1997; Alterkruse et al., 1998)

Las ETA están emergiendo debido a la globalización de alimentos por aumento del comercio internacional, por la introducción inadvertida de patógenos en nuevas áreas y a que viajeros, refugiados e inmigrantes son expuestos a riesgos no conocidos. A medida que el mundo está más interconectado, las enfermedades se diseminan más rápida y eficazmente. La globalización económica ha empujado a los gobiernos a disminuir los presupuestos en varias áreas (Kaferstein et al., 1997), debido a la presión para restringir las actividades del sector público, reduciéndose las actividades de vigilancia epidemiológica en varios países. Otros cambios también favorecen el problema tales como los asociados a los microorganismos, a las poblaciones humanas (aumento de la edad, malnutrición, SIDA) y a los de estilo de vida (comidas fuera de la casa) (WHO, 2002). Se podrían agregar a dichas causas, cambios tecnológicos e industriales, así como la caída en la infraestructura de las políticas de

salud (Alterkruse et al., 1997). El desarrollo económico y el uso de la tierra también influyen; por ejemplo los animales generan más de 1.600 millones de toneladas de materia fecal por año en Estados Unidos pudiendo ser reservorio de varios patógenos (Alterkruse et al. 1997; Alterkruse et al., 1998). Otras características epidemiológicas que favorecen la mayor frecuencia de estos problemas sanitarios se vinculan con la transición a sistemas de producción ganadera más intensiva y a las capacidades de procesamiento sumamente veloces y de enormes volúmenes (Morales, 1998).

Uruguay procura encontrar un perfil que le permita posicionarse en forma más favorable en los mercados internacionales a través de la caracterización y diferenciación de sus productos cárnicos.

Esta temática ha pasado a ser un actor de primer orden en el comercio de los alimentos en las últimas décadas, siendo una preocupación constante en el mercado cárnico. En el capítulo de Inocuidad Alimentaria en carnes rojas se destacan tres grandes actores: las Encefalopatías Espongiformes Bovinas (BSE), *E. coli* O157:H7 y la Salmonelosis. Uruguay luego de una evaluación de riesgo para BSE realizado por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), ha sido catalogado como provisionalmente libre junto a Argentina, Islandia y Singapur, desde 2004 y está propuesta la declaración de país libre de BSE para la próxima reunión de la OIE (MGAP, 2006). Esta categorización ayuda a posicionar los productos cárnicos en el mercado internacional, y se podría ver potenciada si se puede comenzar a demostrar que los otros dos patógenos se encuentran poco frecuentemente.

ANTECEDENTES

Los patógenos microbiológicos en la comida causan aproximadamente entre 6,5 a 36 millones de casos humanos, y más de 9.000 muertes anuales en Estados Unidos, estando involucrados más de 40 agentes diferentes (Buzby et al., 1996), atribuyéndosele a las ETA un costo de U\$S 2.900 a 6.700 millones. En Europa, según la OMS; están aumentando las ETA, entre 1993 y 1998 los brotes de causa bacteriana fueron el 86 %, siendo *Salmonella* las responsables por el 77% del total. (FAO/WHO, 2002).

Los consumidores norteamericanos y europeos son muy sensibles con relación a la inocuidad alimentaria, cuyo concepto incluye desde la presencia de patógenos conocidos en los productos, hasta la resistencia antimicrobiana de los organismos que pudieran estar presentes en los mismos. Dentro de las causas conocidas de enfermedades alimentarias en los Estados Unidos, el 30,2% es atribuido a causas bacterianas (Mead et al., 1999). *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 son dos agentes de significativa preocupación, pues se encuentran en las heces del ganado sano, quienes pueden actuar como reservorios. Por lo tanto, importa identificar y cuantificar la presencia de estos agentes.

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema global. Los principales actores en salud pública temen que nos encontremos en la “era post-antibióticos”, donde la eficacia de los mismos está decayendo frente a los patógenos humanos (Anderson, 1999). La resistencia de *Salmonella* a una gran cantidad de drogas se ha transformado en epidémica en el Reino Unido y ha aparecido en otras partes del mundo incluyendo los Estados Unidos, siendo el vehículo en varias ocasiones, la carne vacuna (Spika et al., 1987; Wall et al., 1995; White et al., 2001). La hipótesis más común en Salud Pública, es relacionar la resistencia a los antimicrobianos asociada a los patógenos de las enfermedades alimentarias a una

secuela del uso de antibióticos en animales, con fines terapéuticos o como estimulantes del crecimiento. Algunos sectores promueven el menor uso del manejo intensivo del ganado y de antibióticos como forma de minimizar el problema de la resistencia microbiana (WHO, 1997).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de producción ganadera del Uruguay determinan características propias de los productos cárnicos. Los ciclos relativamente largos que tienen los sistemas pastoriles determinan una gran variabilidad en los tiempos de terminación del ganado y en características de calidad como ser la terneza. Pero también presentan aspectos positivos, tales como exhibir una composición de la carne más saludable para el consumidor, con menos grasa y colesterol (Gil & Huertas, 2001), y la baja carga de patógenos alimentarios y de cepas resistente a los agentes antimicrobianos, que supuestamente existe. Para demostrar esta hipótesis, se realizó el proyecto “Evaluación de la Inocuidad Alimentaria en el Primer Eslabón de la Cadena de Producción de Carne, en el Uruguay”, dentro de las Líneas de Investigación Aplicadas, cofinanciadas por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Se justifica entonces la búsqueda de estrategias que permitan un mejor posicionamiento en los mercados internacionales, a través del aumento de su valor agregado, fundamentalmente por la caracterización y diferenciación de tales productos. Es en ese marco que la Inocuidad Alimentaria juega un papel preponderante a ser exhibida ante potenciales consumidores, como una característica intrínseca de dicho rubro en nuestro país. Dentro del concepto de Inocuidad Alimentaria se destaca la ausencia de patógenos en los productos y de la resistencia antimicrobiana que pudiera estar presente en los contaminantes de estos. Se puede sostener que con una faena higiénica y que controle los puntos críticos de contaminación, no sería necesario conocer lo que sucede en el ámbito de los establecimientos ganaderos. Sin embargo, hoy la ideología más aceptable es la que asegura desde el nivel del predio productor hasta el plato del consumidor la calidad del producto y su bajo riesgo. La obtención de las muestras directamente de las explotaciones agropecuarias se debe a que éstas son reservorios de los más importantes agentes que producen enfermedades de origen alimentario. Esto está sugerido por una serie de observaciones (Hanckock et al., 1998):

- aislamientos de agentes causales en todas las etapas de producción de alimentos (establecimiento, plantas y cortes comerciales),
- unión epidemiológica del consumo de alimentos de origen animal con enfermedades específicas del hombre (*Escherichia coli* O157 en Estado Unidos en 1993, por carne),
- aislamientos de patógenos potenciales de origen alimentario obtenido de las especies pecuarias compartiendo inconfundibles impresiones genéticas con los que produjeron enfermedad en el hombre (la emergencia del *S. Typhimurium* DT 104 simultáneamente en animales y el hombre refuerza esta relación),
- aumento de salmonelosis no tifoidea, lo que evidencia un reservorio no humano,

- presencia de subtipos de *Escherichia coli* O157 y *Salmonella* implicadas en extensos brotes humanos, que no se mantienen en esas poblaciones, como hubiese ocurrido si el reservorio fuese el hombre.

Si además de demostrar la baja prevalencia de *E. coli* y *Salmonella*, se puede constatar la baja presencia de genes de resistencia antimicrobianos en la población bacteriana de nuestro ganado, se estaría estableciendo un valor agregado a los productos cárnicos a un costo no significativo.

El trabajo presentado en los siguientes capítulos realizó la primer evaluación en el ámbito de los establecimientos productores de ganado para carne del Uruguay, de forma de identificar si *Salmonella* spp y *E. Coli* O157:H7 están presentes, cual es su prevalencia y cual es el grado de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de las bacterias componentes de la flora intestinal de los bovinos. El estudio se enmarca en la filosofía “*desde la concepción hasta el consumo*” el cual está asociado a la trazabilidad y certificación de calidad de productos.

OBJETIVOS

El objetivo general es contar con la información básica para posibilitar el desarrollo de un sistema de acreditación de la calidad sanitaria de las carnes uruguayas en todos los eslabones de su producción, de forma de posicionar las mismas en un nivel preferente de los consumidores.

Este objetivo se ejecutará a través del logro de las siguientes metas:

1. Estimar la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en las heces de los bovinos, de los establecimientos ganaderos del Uruguay, como parte de un sistema de monitoreo en la pre-cosecha.
2. Evaluar los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos en los subtipos no específicos de *Escherichia coli*, aisladas de las heces del ganado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alterkruse S.F., Cohen M. L., Swerdlow D. L., (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis* 3: 285-293
2. Alterkruse S.F., Swerdlow M.P.H., Wells S.J. (1998). Factors in the emergence of foodborne diseases. *Veterinary Clinics of North America: Food animal practice*. 14: 1-15.
3. Anchieri D (2001). Programa integrado de protección de alimentos en Uruguay. *Proceedings of XX Congreso Mundial de Buiatría*, Punta del Este, Uruguay
4. Anderson R.M. (1999). The pandemic of antibiotic resistance. *Nature Medicine* 5: 147-149
5. Buzby J.C., Roberts T., Jordan Lin C.-T., Mac Donald J.M. (1996). Bacteriological foodborne diseases: costs and productivity losses. *Economic Research Service / USDA. Agricultural Economic Report N° 741*.
6. Collins J.E. (1997). Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/ reemergence of foodborne pathogens. *Emerg. Infect. Dis* 3: 471-479.
7. FAO/WHO. (2002). Foodborne diseases are on the rise in Europe. First pan-european conference on food quality and safety. Budapest, 25-28 de Febrero

8. Gil A., Huertas S. (2001). Efectos del Sistema de Producción sobre las características de la carne vacuna. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. FPTA 056. Serie FPTA-INIA 04. 53 páginas. ISBN: 9974-38-127-4.
9. Hanckock D., Lynn T., Besser T. (1998). Sanidad precosecha de los alimentos: es posible y debemos hacerlo? Proceedings of XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paydsandú, Uruguay
10. IICA. (2000). Asuntos Emergentes en Sanidad Agropecuaria e inocuidad de alimentos. Hacia un nuevo enfoque. Dirección de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad de Alimentos, Consorcio Técnico.
11. INPPAZ/OPS (1993). Guía VETA. Programa de Salud Pública Veterinaria, División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles HPV/FOS/103/93.
12. IOM/NRC (1998). Ensuring safe food: from production to consumption. Committee to Ensure Safe Food from Production to Consumption. Institute of Medicine, National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C.
13. Käferstein F.K., Motarjemi Y., Bettcher D.W. (1997). Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 3:503-510.
14. Lindner C. & Savio M. (2002). Vigilancia de las ETA en Uruguay. Sistema Veta. In: Jornada de trabajo para el fortalecimiento y rediseño del sistema VETA. MSP, OPS, OPS/HCP/FOS/URU.08.2002. 8 de Julio, Montevideo, Uruguay
15. Majkowski J. (1997). Strategies for rapid response to emerging foodborne microbial hazards. *Emerg. Infect. Dis* 3: 551-554.
16. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro C., Griffin, P. M., y Tauxe, R. V.(1999). Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607-625.
17. MGAP (2006). Situación de la encefalopatía espongiiforme. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. On line: www.mgap.gub.uy/DGSG/InformacionTecnica/EEB/docum_oie_bse_ROU.pdf
18. Morales R.A. (1998). Microbial risk assessment, economics and food safety. *J. Am Vet. Med. Assoc.* 213: 1746-1749.
19. MSP (1999). 1er. taller nacional del sistema V.E.T.A. Ministerio de Salud Pública, OPS/HCP/HCV/FOS/URU.03/2000
20. Peyrou J. & Ilundain M. (2005). Comportamiento del sector carne vacuna en 2005 y perspectivas para el 2006. Anuario 2005.OPYP-AMGAP
21. Savio M. & Lindner C. (2002). Situación de las ETA en Uruguay. In: Jornada de trabajo para el fortalecimiento y rediseño del sistema VETA. MSP, OPS, OPS/HCP/FOS/URU.08.2002. 8 de Julio, Montevideo, Uruguay
22. Spika J.S., Waterman S.H, Soo Hoo G.W., St. Louis M.E., Pacer E.R., James S.M., Bissett M.L., Mayer L.W., Chiu J.Y., Hall B., Greene K., Potter M.E., Cohen M.L., Blake P.A.(1987). Chloranfenicol- resistance *Salmonella newport* traced through hamburguers to dairy farms. *N. Engl. J. Med.* 316: 565-570
23. Tauxe R.V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 425-434.

24. Wall P.G., Morgan D., Lambden K., Griffin M., Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B. (1995). Transmission of multiresistance *Salmonella* typhimurium from cattle to man. *Vet. Rec.* 136: 591-592
25. White D.G., Zhao S., Sudler R., Ayers S., Friedman S., Chen S., McDermont P.F., McDermont S., Wagner D.D. Meng J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N. Engl. J. Med.* 345: 1147-1154
26. WHO. (1997) Medical impact of antibiotic use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997 WHO/EMC/ZOO/97.4
27. WHO. (2002). Emerging foodborne diseases. Fact Sheet 124.

CAPÍTULO I: ESCHERICHIA COLI O 157:H7

En 1982 por primera vez se identificó una cepa desconocida de *Escherichia coli* expresando antígeno somático O 157 y antígeno flagelar H7, asociada a diarrea sanguinolenta a partir de un mismo origen alimentario (Riley et al, 1983). El primer brote ocurrió en Oregon, EUA y el segundo, tres meses después en Michigan, identificándose a las hamburguesas mal cocidas de una misma cadena de comida rápida como el vehículo, aislándose *Escherichia coli* O157:H7 a partir de los pacientes y de carne picada congelada, proponiéndose a la cepa como causa de la enfermedad, indicando que según el perfil de los plásmidos existía relación entre los aislamientos (Wells et al., 1983). En los últimos años *Escherichia coli* O157:H7 ha estado presente en los diferentes medios de prensa, mayormente de Norteamérica, y el público comenzó a asociar el patógeno a la vida diaria por la posible transmisión por agua de bebida, alimentos en el supermercado, casas de comida, la cocina de la casa y aún el agua de piscinas públicas (Russell et al., 2000). La estimación realizada por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) en EUA de 75.000 casos humanos por año, 2.000 de los cuales necesitan hospitalización y 50 fallecen, demuestran la importancia que la bacteria presenta para la salud humana (Mead et al., 1999). La bacteria ha sido identificada en brotes distribuidos ampliamente, reportándose su presencia en varios países produciendo enterocolitis y secuelas sistémicas (Slutker et al. 1997; Paton & Paton, 1998). En la década de los 80 se creyó que las diarreas humanas causadas por *Escherichia coli* habían desaparecido de los países desarrollados, pero esa situación cambió desde la emergencia de *Escherichia coli* O157:H7 (Griffin & Tauxe, 1991), y el incremento de las infecciones por este patógeno y del síndrome urémico hemolítico asociado, es un importante problema para la salud pública.

Los primeros brotes en EUA fueron a punto de partida de hamburguesas, sandwiches, leche cruda, carne picada y agua (Konowalchuk, 1977; Karmali, 1989).

Clasificación

Escherichia coli O157 pertenece a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), un grupo de cepas definidas por las consecuencias clínicas que producen, pudiendo ocasionar severas enfermedades en los seres humanos, como diarrea sanguinolenta (HC), síndrome urémico hemolítico (HUS) y púrpura trombocitopénica trombótica (TPP), con riesgo de vida para los infectados, constituyendo un grupo emergente de patógenos entéricos para el hombre y los animales (Nataro & Kaper, 1998). *E. coli* productora de toxinas similares a las de *Shigella* (STEC), es así denominada por producir toxinas similares a las que produce la *Shigella dysenteriae* tipo I, stx1 y/o stx2, también referidas como verotoxinas 1 (VT1) y verotoxina 2 (VT2) (O'Brien & Holmes, 1987). Estas toxinas están codificadas por genes lisogénicos, es decir genes que están localizados en bacteriófagos que se integran al genoma bacteriano en forma estable (Strockbine et al., 1986). *E. coli* verotoxigénica (VTEC) es denominada de esa forma por producir efecto citopático en cultivos celulares de células Vero de riñón de mono verde africano (Konowalchuk et al., 1977). STEC y VTEC son términos equivalentes (Karmali 1989). El uso del nombre EHEC refiere a cepas que expresan Stx, causan lesiones de adherencia y borramiento (A/E) en las células epiteliales y posee el plásmido 60-MDal conteniendo los genes para codificar la hemolisina, y constituyen un subtipo de STEC que remarca sus connotaciones clínicas y patógenas (Griffin & Tauxe, 1991). Si bien se han aislado en estos

pacientes varios serogrupos de EHEC, el más asociados a este tipo de afecciones es *E. coli* O157 (Griffin & Tauxe, 1991; Armstrong et al., 1996). Otras cepas EHEC son O26, O103, O111, O145, que también son frecuentemente aisladas de pacientes humanos con HC y HUS (Nataro & Kaper, 1998). Hay más de 200 cepas de *Escherichia coli* O:H (tabla de VTEC por K. A. Bettelheim , en www.microbionet.com.au/vtetable.htm) de las cuales O157:[H7], O145: [H28], O111:[H8], O103:H2, y O26:[H11] se reconocen como EHEC clásicas distribuidas por todo el mundo. La tipificación fágica presenta dificultades para mantener el stock de fagos, es una técnica cara y que consume tiempo y tiene poco poder discriminatorio (Nataro & Kaper, 1998). Se concluye en uno de los estudios de subtipificación epidemiológica que la tipificación por fagos y la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE) representan procedimientos complementarios y que el uso combinado de esos procesos permiten una óptima discriminación (Preston et al., 2000). Estudios comparativos indican que el perfil de plásmidos es una técnica poco discriminatoria. El análisis de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) es un método que corta el cromosoma en cientos de fragmentos usando enzimas de restricción y emplea sondas de DNA, pudiéndose analizar el trozo de cromosoma por técnicas como Southern blotting, pero si bien es una técnica sensible es sumamente laboriosa. La ribotipificación es un método RFLP que usa como sonda un plásmido conteniendo el operón rRNA, pero no se considera suficientemente discriminatorio.

Propiedades

Escherichia coli O157:H7 como prototipo de EHEC no fermenta el sorbitol, como la mayoría de *Escherichia coli* (Wells et al. 1983) y no produce β -glucuronidasa, y tampoco crece con temperaturas superiores a los 41° C, por lo cual no se detecta por los procedimientos comunes de conteo de coliformes en agua o alimento (Raghubeer & Matches, 1990). La temperatura mínima a la cual hay crecimiento es de 8 a 10°C (Buchanan & Doyle, 1997). Las EHEC son ampliamente resistentes a pH bajos, sobreviviendo transitoriamente expuestos a pH extremos de 1.5 a 3.0 y por más tiempo a rangos más moderados de 3.0 a 4.5 (Buchanan & Edelson, 1996). Esta cualidad le permite resistir las condiciones ácidas del estómago y sobrevivir en alimentos como sidra, mayonesa y subproductos cárnicos (Leyer et al. 1995) Las stx producidas por *E. coli* están agrupadas en dos grupos, de los cuales stx1 está genéticamente cerca de de la toxina producida por *S. dysenteriae* , mientras que la stx2 está más lejana, y presenta por lo menos cinco variantes principales (Mainil & Daube, 2005). La stx2 es 56% homóloga con stx1 (Kehl, 2002). No todas las stx son igualmente activas en diferentes líneas celulares. Estas stx se producen en el intestino luego de la colonización de las EHEC, y cruzan la pared intestinal, ingresando en el torrente circulatorio. Si bien algunos autores han propuesto que las stx son enterotóxicas, hoy se considera que las lesiones A/E están más relacionadas a la producción de diarrea.

Como la capacidad de producir Stx no es suficiente para que *Escherichia coli* sea patógena, se requiere de otros marcadores de virulencia. Las lesiones A/E se dan en varios pasos de los cuales el primero es la adherencia de la bacteria a la superficie de la célula del hospedador, disparando la expresión de diversos genes localizados en una isla de patogenicidad en el cromosoma, el locus LEE, vía un plásmido regulador. Una porción del genoma bacteriano denominada locus de borrado de enterocitos (LEE) contiene los genes requeridos para las lesiones a nivel de pared intestinal,

además de la intimina, como lo son un sistema de secreción tipo III, varias proteínas efectoras segregadas (Esp) y un receptor (Tir) (Nataro J.P. & Kaper J.B. 1998; Paton et al. 2001). El segundo paso consiste en el envío de señales dentro de la célula eucariota a través de un sistema de secreción tipo III, codificado por genes *esc* y *sep* en LEE, y por medio de la fosforilación de varias proteínas de la célula, producidas por proteínas secretadas (codificadas por genes *esp*) causan la polimerización de la actina, cambios en el citoesqueleto y destrucción de las microvellosidades. El último paso es la adherencia de la bacteria a la pared citoplásmica desnuda del enterocito, por medio de la intimina; esta proteína es codificada por el gen *eae* siendo la responsable del fenómeno de adherencia y borrado de las células epiteliales en la mucosa intestinal, y está asociada a la diarrea severa, fundamentalmente hemorrágica y HUS (Blanco et al. 2004). Sorprendentemente el receptor celular es también una proteína bacteriana, receptor translocado de intimina (Tir), codificada por el gen *tir* ubicado también en LEE. Aunque espectacular esta lesión A/E no es directamente responsable de la diarrea (Mainil & Daube, 2005).

Otro factor que también puede afectar la virulencia de STEC es la entero hemolisina (Ehly), codificada por el gen *ehxA* (Schmidt et al. 1995). Hay varios tipos de Ehly, siendo uno específico de las EHEC, llamado Ehx, que es codificado por cuatro genes localizados en un plásmido de 60 MDal (pEHEC).

Uno solo de estos factores no puede considerarse responsable de la virulencia de STEC; un análisis multivariado de esos factores manifestó que la intimina y la Stx2 eran los que estaban más fuertemente asociados a la severidad de la enfermedad humana y que esto no sucedía con la hemolisina (Boerlin et al. 1999). Stx, intimina y enterohemolisina son considerados los factores de virulencia primarios, aunque otros menos estudiados pueden ser importantes, incluyendo otras hemolisinas, otros factores de adherencia intestinal y el lipopolisacárido O157 (LPS) (Nataro & Kaper, 1998).

Epidemiología

Las características de los padrones de transmisión sugieren que la dosis infectiva es baja (Griffin & Tauxe, 1991). Esta característica estaría asociada a la resistencia de la bacteria a la acidez, habiéndose sugerido que las cepas asociadas a brotes tienen esa tolerancia elevada (Buchanan & Edelson, 1996).

Es poco lo que se conoce de las infecciones esporádicas de *Escherichia coli* O157:H7, a pesar de que probablemente sean más comunes que los brotes (Griffin & Tauxe, 1991). La mayoría de los conocimientos acerca de la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7 proviene de la investigación de brotes (Armstrong et al., 1996). La infección en el hombre está asociada mayormente al consumo de productos cárnicos, siendo el principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7 la especie bovina (Griffin & Tauxe, 1991; Armstrong et al., 1996). El otro alimento que es sistemáticamente controlado es la leche y sus subproductos, habiéndose aislado la bacteria en leche cruda (Wells et al., 1991), quesos (Pradel et al, 2000) y yogurt. En los casos en que se involucra a alimentos que no son de origen bovino, como sidra, papas, mayonesa, lechuga, brotes de soja, se debe sospechar la contaminación cruzada por carne o contaminación con materia fecal de bovinos (Armstrong et al., 1996). La transmisión por agua puede producirse por su ingestión (Swerdlow, 1992; CDC, 1999) o asociado a baños en lagos (Keene, 1994), y también está descrita la transmisión de persona a persona (Armstrong et al., 1996).

La eliminación fecal por parte de los bovinos de *Escherichia coli* O157:H7 es intermitente y de corta duración, generalmente unas pocas semanas o meses (Brown et al., 1997; Cray & Moon, 1995). Las mismas cepas han sido aisladas de diferentes regiones y en diferentes momentos, pudiéndose también aislar más de una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 de las heces de un mismo animal o de diferentes de un mismo lote (Faith et al., 1996). La inoculación del patógeno experimentalmente por vía oral induce la producción de anticuerpos, pero esta respuesta serológica no se corresponde con la excreción por heces (Johnson et al., 1996) y es de corta duración ya que la reinfección del ganado se observa frecuentemente. Otros animales pueden ser reservorio de *Escherichia coli* O157:H7, como es el caso de los otros rumiantes como los ovinos (Kudva et al., 1996), y también otras especies como cerdos, pollos, perros y gatos pueden albergar el patógeno, siendo su presencia menos frecuente que en rumiantes (Beutin et al. 1993).

Armstrong et al. en 1996, postulan tres grandes hipótesis para explicar la emergencia de la infección en humanos: 1) emergencia de la bacteria en poblaciones animales, 2) existencia previa de la bacteria en poblaciones animales con cambios en la faena y las prácticas de manejo de la carne contribuyen a aumentar la contaminación de los alimentos, 3) cambios en los hábitos alimenticios del consumidor con presencia previa del patógeno en la carne. VTEC es citado frecuentemente como ejemplo de adaptación microbiana y emergencia, sirviendo como modelo de patógeno que ha hecho su aparición en la sofisticada industria del primer mundo (Armstrong et al., 1996).

Clínica

Las cepas de EHEC y VTEC se podrían clasificar clínicamente en tres clases: (1) aquellas ligadas más frecuentemente a humanos y excepcionalmente a animales (esencialmente EHEC-1 y VTEC-1) (2) aquellas frecuentemente asociadas a enfermedad en animales y personas (esencialmente EHEC-2) y (3) las más raramente asociadas con enfermedades en el hombre o animales (esencialmente VTEC-2) (Mainil & Daube, 2005). En consecuencia, esquemáticamente se puede decir que las EHEC, producen diarrea, HC, HUS y TTP en el hombre, diarrea hemorrágica en terneros jóvenes, siendo los bovinos mayores y otros rumiantes, portadores sanos, mientras que VTEC son causa de HUS y TTP humanas y están presentes en ganado adulto y ovinos y cabras, siendo responsables de producir la enfermedad de los edemas en lechones.

Las stx en el torrente sanguíneo se dirigen hacia el intestino el riñón y el sistema nervioso central cuyas células poseen el receptor glicolipídico apropiado (Paton & Paton, 1998), y una vez fijada a través de la subunidad B a su receptor son internalizadas dentro de las células blanco, por endocitosis. La otra subunidad, A, es la fracción enzimáticamente activa y es clivada en un fragmento A1 con acción catalítica que produce un bloqueo irreversible de la síntesis proteica (Rivero et al., 2004). Otros factores de virulencia como la enterohemolisina y la proteasa EspP, probablemente jueguen un rol en la amplia gama de presentaciones clínicas en el hombre, así como mediadores de inflamación del huésped (Paton & Paton, 1998).

Patogenia

Si bien la cepa más conocida de EHEC es la O157:H7, y entre los serotipos de VTEC los más comunes son O91:H21 y O113:H21, más de 130 serogrupos O en

combinación con varios serogrupos H se han descrito y aparecen nuevos cada año (Blanco et al, 2004). Más de 100 serotipos se han aislado de pacientes con HUS, variando la incidencia de serotipos geográficamente (Mainil & Daube, 2005). Los aislamientos que producen stx2 están más asociados a HUS, que aquellos que producen Stx1. Las cepas aisladas de casos humanos de HC, HUS y TTP producen Stx1, Stx1/Stx2 o Stx2 y en el 100% de los casos poseen pEHEC y hemolisina, al igual que las encontradas en rumiantes sanos y alimentos. Este perfil de Stx no está asociado con los casos de diarrea en terneros y no son relevantes los hallazgos de pEHEC ni hemolisina EHly. La especificidad de huésped o portador, si existe, no reside en los Stx, ni en los genes localizados en LEE, ni en los genes ubicados en el plásmido pEHEC. Aunque LEE es un factor de virulencia importante no es esencial para producir la enfermedad humana (Paton et al., 2001).

Diagnóstico

Las cepas del serotipo O157:H7 tienen características que las diferencian de las demás y facilitan su cultivo y detección (Blanco et al., 2001). Se diferencian de cepas no-O157, por su incapacidad de fermentar el sorbitol, no poder crecer a 44°C, no presentar β -glucuronidasa evaluada su acción frente al sustrato 4-methylumbelliferil- β -D-glucurónido, crecer en presencia de telurito y cefiximina y presentar el gen *eae*, el plásmido pCVD419 que es un fragmento de pEHEC usado como sonda, y la enterohemolisina EHly. *Escherichia coli* O157:H7 se puede identificar con facilidad a partir de sus características de no fermentar el sorbitol y carecer de acción de β -glucuronidasa, características que al no poseer *VTEC* no-O157:H7, puede llevar a minimizar su presencia falsamente (Thran et al., 2001). Para detectar estas últimas cepas se precisan otras técnicas como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que desafortunadamente ninguna de ellas tiene un marcador bioquímico conocido para facilitar las pruebas de tamizaje en laboratorios (Mead & Griffin, 1998). Con la emergencia de *Escherichia coli* O157:H7 los diagnósticos se dirigieron a detectarlo, fundamentalmente utilizando sus propiedades bioquímicas, anotadas más arriba. Se utilizan técnicas inmunoenzimática que utilizan enzimas específicas de serotipo *Escherichia coli* O157 directamente de materia fecal (Kehl, 2002), con sensibilidad de 73 a 100% en comparación con el cultivo sorbitol MacConkey, que de por sí es poco sensible (Dylla et al., 1995); otras desventajas es su costo y que sólo detecta *Escherichia coli* O157. Las técnicas de PCR para shigatoxinas o para otros factores de virulencia y las sondas de DNA son test sensibles no muy comúnmente usados, por su costo.

Actualmente los especialistas coinciden en la opinión de que el mejor método para detectar *Escherichia coli* O157:H7 en muestras y alimentos es la técnica de separación inmunomagnética, usando previamente caldo de enriquecimiento (Chapman et al., 1994). Este método es el utilizado en el trabajo presentado en el apartado “Prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en la ganadería del Uruguay”, donde se detalla la técnica y se comenta su empleo y comparación con otras pruebas.

Control

Existen medidas preventivas para disminuir los riesgos como evitar el consumo de carne no suficientemente cocida, leche y jugos no pasteurizados (Mead & Griffin, 1998). Además la información a las autoridades ante casos inusuales de diarrea

sanguinolenta es una correcta medida de vigilancia epidemiológica tendiente a disminuir la frecuencia de la infección.

Los alimentos y las prácticas de manejo sospechosas de estar asociadas a brotes de *Escherichia coli* O157:H7, incluyen carne picada mal cocida, leche cruda, sidra y jugo de manzana no pasteurizado, salame, lechuga, productos de campos fertilizados con abono, papas, brotes de alfalfa y rábano, yogurt, sandwiches y agua (Buchanan & Doyle, 1997). En consecuencia para reducir los riesgos de infectarse con el patógeno, se recomienda cocinar la carne picada concientemente antes de comerla, beber sólo leche y jugos de manzana pasteurizados, lavar rigurosamente frutas y vegetales, lavarse las manos luego de trabajar con animales, particularmente rumiantes o luego de estar en contacto con personas con diarrea, no usar materia fecal fresca como fertilizante para vegetales y frutas y evitar nadar en lagos o lagunas usadas por ganado ni tomar agua que no haya sido adecuadamente tratada contra patógenos.

Es de suma importancia tener un conocimiento de base de la situación epidemiológica referida a la presencia de *Escherichia coli*, para luego poder tomar las medidas que correspondiesen. El trabajo presentado en el próximo apartado es un primer intento de acercarse a reconocer esa realidad, y actuar en consecuencia, en vista de que la bacteria es agente de zoonosis y se debe considerar dentro de la Inocuidad Alimentaria, caracterizando la calidad de las carnes producidas en el país.

Bibliografía

1. Armstrong G. L., Hollingsworth J., Morris J. G. J. (1996) Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developing world, *Epidemiol. Rev.*, 18: 29–51
2. Beutin L., Geier D., Steinbrück H., Zimmermann S., Scheutz F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2483-2488
3. Blanco J.E., Blanco M., Alonso M.P., Mora A., Dahbi G., Coira M.A. Blanco J. (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* 42: 311–319.
4. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. (2001). Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Ed. Duffy, G. Garvey, P. McDowell, D.A. Food & Nutrition Press. Inc., Trumbull, CT, USA. pp113-148
5. Boerlin P., McEwen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L. (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol* 37: 497-503.
6. Brown C.A., Harmon B.G., Zhao T., Doyle M.P. (1997). Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 27-32.

7. Buchanan R.L. & Doyle M.P. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technol.* 51: 69-76.
8. Buchanan R.L. & Edelson S.G. (1996). Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4009-4013.
9. CDC. (1999). Public Health Dispatch: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* Among Attendees of the Washington County Fair -- New York, 1999. *MMWR, Weekly, Ser.* 19, 48(36);803
10. Chapman P.A., Wright D.J., Siddons C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin producing *Escherichia coli* from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 40: 424-427
11. Cray W.C. Jr. & Moon H.W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586-1590
12. Dylla B. L., Vetter E. A., Hughes J. G., Cockerill III F. R. (1995). Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:222–224.
13. Faith, N. G., Shere, J. A. Brosch, R. Arnold, K.W. Ansay, S. E. Lee, M. S. Luchansky, J. B. Kaspar, C.W. (1996). Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1519–1525.
14. Griffin P. M. & Tauxe R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 13 :60–98.
15. Johnson, R.P. Cray, W.C. Johnson, S.T. 1996. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7 *Infect. Immun.* 64: 1879-1883.
16. Karmali M.A. (1989). Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15-38.
17. Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Williams L.P., Hedberg K., Oxman G.L., Barrett T.J., Pfaller M.A., Fleming D.W. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331: 579-84.
18. Kehl S.C. (2002). Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J Clin Microbiol* 40: 2711-2715.
19. Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775-779
20. Kudva I.T., Hatfield P.G. Hodve C.J. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 34: 431-433
21. Leyer G. J., Wang L.-L., Johnson E. A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3752–3755.

22. Mainil, J.G. Daube, G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and food: who's who? *J. Appl. Microbiol.* 98: 1332-1344
23. Mead, P. S. & Griffin, P. M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7, *Lancet*, 352, 1207–1212
24. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe, R. V. (1999) . Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607–625
25. Nataro J.P. & Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201
26. O'Brien A.D., Holmes R.K. (1987). Shiga and Shiga-Like Toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
27. Nataro J.P. & Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli* . *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201
28. Paton J.C. & Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
29. Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun* 69: 6999-7009.
30. Pradel N., Livrelli V., De Champs C., Palcoux J-B., Reynaud A., Scheutz F., Sirot J., Joly B., Forestier C. (2000) Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. . *J Clin Microbiol* 38:1023-1031
31. Preston M.A., Johnson W., Khakhria R., Borczyk A. (2000). Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2366-2368
32. Raghubeer E.V. & Matches J.R. (1990). Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* 28: 803-805.
33. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Mc Gee, H.B. Wells, J.G. Davis, B.R. Hebert, R.J. Olcott, E.S. Johnson, L.M. Hargrett, N.T. Blake, P.A. Cohen, M.L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England J. of Medicine.* 308:681-685
34. Rivero, M.A. Padola, N.L. Etcheverría, A.I. Parma, A.E. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 64: 352-356
35. Russell J.B. Diez-González F. Jarvis G.N. (2000). Symposium: farm health and safety. Invited review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 863-873.
36. Schmidt H., Beutin L., Karch H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63:1055–1061
37. Slutsker L., Ries A.A., Greene K.D., Wells J.G., Hutwagner L., Griffin P.M. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiological features. *Ann. Intern. Med.* 126: 505-513

38. Strockbine N.A., Marques L.R.M., Newland J.W., Smith H.W., Holmes R.K., O'Brien A.D. (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encodes antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* 53:135-140.
39. Swerdlow D.L., Woodruff B.A., Brady R.C., Griffin P.M., Tippet S., Donnell H.D. Jr., Geldreich E., Payne B.J., Meyer A. Jr. Wells J.G. (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117: 812-819.
40. Thran B.H., Hussein H.S., Hall M.R., Khaiboullina. (2001). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J. Food Prot.* 64: 1613-1616
41. Wells J.G, Shipman L. D., Greene K. D., Sowers E. G., Green J. H., Cameron D. N., Downes F. P., Martin M. L., Griffin P. M., Ostroff S. M., Potter M. E., Tauxe R. V., Wachsmuth I. K.(1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype 0157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* 29:985-989
42. Wells J.G., Davis B.R., Wachsmuth I.K., Riley L.W. Remis R.S., Sokolow R., Morris G.K. (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 18: 512-520
43. Wells J.G, Shipman L. D., Greene K. D., Sowers E. G., Green J. H., Cameron D. N., Downes F. P., Martin M. L., Griffin P. M., Ostroff S. M., Potter M. E., Tauxe R. V., Wachsmuth I. K.(1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype 0157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* 29:985-989

PREVALENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN LA GANADERÍA DEL URUGUAY

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es un grupo de cepas de la bacteria *E. coli* que pueden ocasionar severas enfermedades en los seres humanos, como diarrea sanguinolenta, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica, con riesgo de vida para los infectados, constituyendo un grupo emergente de patógenos entéricos para el hombre y los animales (Nataro & Kaper, 1998). *E. coli* productora de toxinas similares a las de *Shigella* (STEC) y *E. coli* verotoxigénica (VTEC) son términos equivalentes y se refieren a cepas que producen una o más toxinas del grupo Stx. El uso del nombre EHEC refiere a cepas que expresan Stx, causan lesiones de adherencia y borramiento (A/E) en las células epiteliales y posee el plásmido 60-MDa. Las EHEC constituyen un subtipo de STEC que remarca sus connotaciones clínicas y patógenas.

Si bien se han aislado de pacientes con los síndromes señalados varios serogrupos de EHEC, el más asociado a este tipo de afecciones es *E. coli* O157 (Griffin & Tauxe, 1991; Armstrong et al., 1996). El primer brote reconocido ocurrió en 1982, en Oregon y Michigan asociado a la ingestión de hamburguesas, (Riley et al., 1983), y desde entonces fue identificada la bacteria en grandes brotes distribuidos ampliamente por todo el mundo, siendo reportada su presencia en varios países provocando enterocolitis y secuelas sistémicas (Slutsker et al., 1997; Paton & Paton, 1998). La importancia de esta infección está dada por la estimación realizada por el CDC en EUA de 75.000 casos humanos por año, 2.000 de los cuales necesitan hospitalización y 50 fallecen (Mead et al., 1999). El ganado bovino ha sido señalado como el principal responsable de la contaminación al hombre, a través de la cadena alimentaria, aunque hay varias otras especies responsabilizadas en la excreción del microorganismo (Mead & Griffin, 1998; Beutin et al., 1993).

Un porcentaje de bovinos elimina *E. coli* O157 en sus materias fecales (Galland et al., 2001; Hancock et al. 1997; Chapman et al., 1993), aunque esta excreción es intermitente en los individuos (Shere et al., 1998). *E. coli* O157 no produce síntomas clínicos en el ganado (Armstrong et al., 1996), encontrándose el organismo en las heces de animales sanos en varios estudios, lo que indica que es un comensal inocuo común en vacunos. También se ha encontrado en terneros con diarrea, sugiriéndose que *E. coli* podría ser la causa, aunque no se ha podido demostrar experimentalmente en forma definitiva (Cray & Moon, 1995).

Se ha intentado prevenir la contaminación del hombre por el microorganismo en diferentes puntos de la cadena cárnica, bajo el concepto integral del “campo al plato”. En tal sentido se han realizado varios estudios a nivel de establecimiento productor, como primer eslabón de esa cadena, buscando asociaciones de diversos factores con la presencia del agente, con la finalidad de establecer pautas que permitan reducir el riesgo de contaminación (Smith et al., 2001; Dargatz et al., 1997).

En varios lugares y momentos se ha evaluado la presencia de *E. coli* O157, observándose que la prevalencia encontrada últimamente es más alta, debido al mejoramiento de las pruebas diagnósticas (Meyer-Broseta et al., 2001), observación que también se presenta en otros puntos de la cadena cárnica (Gansheroff & O'Brien, 2000). La prevalencia de *E. coli* O157 es más alta en Estados Unidos que en Europa: 2 a 20% vs. 0 a 3% a nivel de establecimientos ganaderos, representando menos de un 1 % de los animales (Mainil & Daule, 2005). Se han producido gran cantidad de

estudios epidemiológicos en los primeros estadios de la industria de la carne, y como consecuencia hay varios estudios a nivel de predio y de frigorífico, cuyo análisis permite una mejor comprensión de la epidemiología en animales y el hombre, procurando establecer medidas de control para reducir el riesgo de infección humana. Hay que tener presente que los diferentes métodos estadísticos empleados en los estudios así como las técnicas de laboratorio utilizadas, factores geográficos y estacionales, edad y categoría de los animales, tipo de explotación, influyen en los resultados obtenidos. Meyer-Broseta et al. (2001), revisaron datos obtenidos a campo y en playa de faena, en Estados Unidos y Europa, poniendo de manifiesto las diferentes características de los ensayos, y concluyeron confirmando que con el diseño clásico la contaminación por el patógeno es frecuente: 3 a 8 % de los predios ganaderos y 0.5 a 1% de los animales. Se señala que las grandes diferencias en la prevalencia, presentadas en una revisión de varios estudios, es un artefacto dado por las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas (Armstrong et al., 1996; Blanco et al., 2001) Los resultados de los estudios de prevalencia también se ven influidos por el tipo de explotación, las diferencias en la composición de la flora intestinal, el manejo de los animales, y variaciones estacionales y regionales (Heuvelink et al., 1998 b).

En el Hemisferio Sur también es importante la presencia de EHEC, como en Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica, siendo más frecuentes los hallazgos de otras cepas de *E. coli* (Nataro & Kaper, 1998). En Australia es poco común aislar *E. coli* O157, aunque es frecuente asociar otras cepas a la enfermedad en el hombre (Elliott et al., 2001). Es más alta la prevalencia en animales sanos en aquellos países que demuestran altas tasas de enfermedades humanas, a excepción de España donde la alta frecuencia de aislamientos de *E. coli* O157 en animales y alimentos, coexiste con la baja incidencia de afecciones humanas (Blanco, 2001). En Brasil la ocurrencia de enfermedad humana por EHEC es baja (Giraldi et al., 1990), sin embargo se encontró una alta tasa de secuencias génicas *stx*, indicativas de la presencia de STEC en ganado sano en Río de Janeiro, aislándose en este estudio *E. coli* O157 por primera vez en Brasil (Cerqueira et al., 1999). En regiones del sur de Brasil, el ganado del 95% de pequeñas explotaciones estaba infectada con STEC, no realizándose tipificación de las cepas, lo que hace deducir a los autores que éstas no pertenecen a los tipos que afectan a los hombres (Moreira et al., 2003). En general las infecciones por STEC se restringen a casos esporádicos de diarrea no sanguinolenta, mayormente en niños, y a pesar de que hace relativamente poco tiempo se identificó *E. coli* O157 (Irinó et al., 2002), esta cepa no es la más frecuentemente aislada. En Brasil se aisló el serotipo *E. coli* O157:H7 en muy baja cantidad, y sólo de animales reservorios, comparando con la detección frecuente en Argentina (40.9%) tanto de animales como de alimentos (Guth et al., 2003). En Argentina el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es endémico (Rivas et al., 1998), con 300 nuevos casos por año, una incidencia anual estimada de 8.6 por 100.000, en niños menores de cinco años, siendo responsable de un 28% de los trasplantes renales. Se ha asociado la infección por *E. coli* O157:H7 y la enfermedad en humanos, aislándose la cepa en 3.9% de muestras de carne picada, embutidos en comercios al menudeo (Chinen et al., 2001), mientras que se recuperó la bacteria en el 0.5% de muestras obtenidas de terneros en su mayoría clínicamente sanos (Chinen et al., 2003). En un estudio longitudinal en engorde a corral (feedlot) en Argentina se demostró una alta prevalencia de STEC en ganado (62.7%), hallando varios serotipos, entre los cuales se halló *E. coli* O157:H7 en 6.8% (Padola et al., 2004). En Argentina sólo el 50% de los casos de SUH se asocian al serotipo O157:H7,

aislándose del resto de los pacientes cepas no-O157:H7 (Rivero et al., 2004). Un reporte primario efectuado en Colombia demuestra que *E. coli* O157:H7 es una causa emergente de diarrea endémica en niños y que la cadena de transmisión está presente al constatar el aislamiento del patógeno en 6.5 % de hisopados rectales de ganado y una prevalencia entre niños con diarrea, de 7.2%, hallándose presente en productos cárnicos (Mattar & Vásquez, 1998).

En Uruguay se busca rutinariamente *E. coli* O157:H7 en frigoríficos por requerimiento de los mercados compradores y no se ha podido identificar estimándose su riesgo como muy bajo (Gil et al., 2004). El único caso reportado en humanos fue aislado en el año 2002 en una niña de 16 meses de la ciudad de Melo, Cerro Largo (Gadea et al., 2004), por lo cual se sospecha una baja prevalencia. En Uruguay la prevalencia del SUH, que puede potencialmente ser producido por esta bacteria, es de 4-5 cada 100.000 niños de 5 años o menores.

Uruguay tiene una ganadería de carne que se caracteriza por un manejo extensivo, con una baja carga de animales por superficie, con sistemas donde prácticamente no se utilizan concentrados alimenticios y las pasturas constituyen la base de la alimentación a cielo abierto. Estos factores hacen presumir que la presencia de *E. coli* sea muy baja.

Este estudio realizó la primera evaluación en el ámbito de los establecimientos productores de ganado para carne del Uruguay, procurando identificar si *E. coli* O157:H7 está presente y cual es su prevalencia. Se plantea un estudio transversal de la población con una cobertura anual para controlar el factor estacional, que ha sido señalado como relevante en otros estudios en Estados Unidos y Europa (Hancock et al., 1994; Chapman et al., 1997; Dunn et al., 2004; Heuvelink et al., 1998; Ogden et al., 2004) proponiendo como objetivo estimar la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en las heces de los bovinos, de los establecimientos ganaderos del Uruguay, como parte de un sistema de monitoreo en la pre-cosecha.

II. MATERIALES Y METODOS

El estudio busca aislar *E. coli* O157 en muestras de materia fecal de bovinos en sus etapas previas al envío a faena. Los animales fueron elegidos según un diseño de muestreo que permitiese determinar la presencia de los patógenos en este nivel de la cadena de producción de carne vacuna, dentro de márgenes de confianza que se consideran suficientes como para avalar, en una primera instancia la calidad del producto a nivel nacional. Se planteó la estrategia de seguir los lineamientos y protocolos utilizados en estudios similares realizados por el Sistema de Monitoreo Nacional de Salud Animal (NAHMS) en EUA, con algunas adaptaciones en el diseño. De esta manera los datos obtenidos en ambos países pueden ser objeto de comparación. Como ya se mencionara, se plantea un estudio transversal de la población con una cobertura anual para controlar el factor estacional.

Diseño de Muestreo

Para la selección de la muestra, se tomó la base de datos de la Dirección de Contralor de Semovientes, de la Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, correspondiente al año 2001 como marco de muestreo. Se identificó como principal objetivo del muestreo los novillos de 3 años o más, por lo cual se decidió excluir aquellos establecimientos que tenían menos de 30 animales en esa categoría. El muestreo fue en dos etapas, en la primera etapa la

unidad primaria de selección fueron los establecimientos que estaban estratificados en 3 categorías: engorde a corral intensivo (feedlot), engorde tradicional (pasturas) y engorde de novillos en establecimientos lecheros (lechería). Dentro de cada estrato, se seleccionaron aleatoriamente por números generados en una computadora 30 establecimientos del giro lechero, 100 del giro ganadero y se incluyeron todos los establecimientos que engordan animales a corral (feedlot). Se sortearon 130 predios previendo que alguno no pudiese participar, tomado 120 de ellos para el estudio. De tal manera se estableció que serían estudiados 10 establecimientos por mes, durante un año, lo que resultaba viable según los recursos disponibles. Se tomó una muestra proporcionalmente mayor en establecimientos lecheros, estableciendo un sesgo, teniendo en cuenta que ese sistema de producción teóricamente podría presentar mayor frecuencia de aislamientos del patógeno, por su mayor tasa de contacto entre animales. Se requerían 8 predios ganaderos y 2 lecheros por mes, totalizando 96 y 24. Los feedlots fueron agregados en una segunda instancia. En la segunda etapa de selección la unidad secundaria de selección fueron los novillos de 3 años o más, los cuales se seleccionaron en forma sistemática. Se utilizó como límite inferior de peso de la categoría novillo en etapa de terminación 300 kg para las razas carniceras y 380 kg para las razas lecheras. Los predios de sistema intensivo incluyen a la totalidad de las trece firmas pertenecientes a productores afiliados a la Asociación Uruguaya de Productores de Carne Intensiva Natural (AUPCIN).

El tamaño de la muestra propuesto es de 50 novillos en cada uno de los 120 establecimientos seleccionados. Este número de establecimientos permite detectar con un 95% de confianza al menos un establecimiento positivo si su frecuencia es igual o mayor al 2,5 %. El número de novillos muestreados dentro de los establecimientos permite detectar con un 95% de confianza aquellos que tengan una prevalencia de 6% o más del agente estudiado.

Al nivel de población de novillos y de agentes, asumiendo que en promedio se muestrearán 40 novillos por establecimiento y que el efecto de diseño no sea superior a 5 se estima que se podrá detectar una prevalencia mayor o igual 0,3% de los agentes en estudio.

El análisis fue realizado con el paquete estadístico STATA/SE versión 8.2 (StataCorp, 2003). Para analizar las estimaciones de prevalencia se consideró el diseño del muestreo. Para establecer la prevalencia de establecimientos positivos, se definió como establecimiento positivo todo aquel que tuviera al menos un aislamiento del agente considerado (*E. coli* O157:H7). En el análisis de los establecimientos se ponderaron las estimaciones en función de la inversa de su probabilidad de ser seleccionados y se consideró la estratificación por giro de producción. Para las estimaciones a nivel de bovinos se ponderaron los datos a través de la inversa del producto de la probabilidad de seleccionar el establecimiento por la probabilidad de seleccionar ese animal dentro del establecimiento y la categoría, se consideró la estratificación y que las unidades de muestreo secundario (novillos) forman conglomerados (clusters) dentro de los establecimientos. (Dargatz & Hill, 1996; Skinner et al., 1989)

Recolección de muestras Las muestras se obtuvieron directamente del tracto intestinal, o del piso de los corrales en los feedlots y se refrigeraron hasta su envío al laboratorio. Los animales que fueron seleccionados eran novillos de más de 320 a 380 kilos, pertenecientes a diferentes razas, fundamentalmente Hereford en predios con ganadería para carne como ingreso principal. Las muestras tuvieron un peso mayor a los 30 gramos por animal, ya que se vio un aumento de la sensibilidad relativa con el tamaño de la muestra (Funk et al., 2000), descartándose el uso de

hisopados; esto se debería al hecho de que los agentes no están distribuidos uniformemente en las heces.

Los establecimientos se muestrearon a razón de aproximadamente 10 por mes durante el período de un año, con el propósito de evitar la influencia de factores ambientales descritas. (Hancock et al. , 1994; Chapman et al., 1997; Dunn et al., 2004; Heuvelink et al., 1998 a). Se recogieron datos identificatorios del establecimiento y de la población animal. Se planteó que la recolección de muestras se realizara entre los meses de junio de 2002 a mayo de 2003

En la tabla I se resumen los datos de la población ganadera del Uruguay según la declaración jurada de DICOSE, la cual fue tomada como referencia para definir el marco de muestreo

Tabla I. Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento. DICOSE 2001

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Vacas	Novillos por edad		
				≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	636.166	1.589	237.590	57.534	45.896	52.864
Canelones	231.873	4.227	76.847	17.439	23.485	22.327
Cerro Largo	849.699	2.990	317.199	66.069	63.736	68.825
Colonia	463.020	3.076	152.588	9.707	42.801	70.611
Durazno	697.272	2.090	249.748	64.555	59.772	58.274
Flores	362.994	926	121.206	22.860	31.382	40.138
Florida	745.892	2.896	283.732	45.209	55.647	56.885
Lavalleja	646.135	3.534	237.025	49.086	47.578	57.017
Maldonado	246.964	2.196	93.519	14.625	16.556	19.792
Montevideo	2.178	98	695	71	124	228
Paysandú	699.176	2.073	242.778	47.850	56.767	73.491
Río Negro	561.069	1.246	175.462	21.830	56.011	71.557
Rivera	608.049	2.303	237.536	39.726	33.596	45.993
Rocha	675.722	2.526	253.560	30.847	51.530	65.924
Salto	681.916	1.878	250.838	46.529	50.047	57.943
San José	384.244	2.905	150.517	8.203	25.060	37.894
Soriano	657.331	2.262	165.465	25.894	82.020	116.811
Tacuarembó	881.624	2.786	322.340	85.526	63.035	64.232
Treinta y Tres	567.466	2.023	239.230	26.753	34.130	40.543
T O T A L	10.598.790	43.624	3.807.875	680.313	839.173	1.021.349

Laboratorio

Se trabajó en el Laboratorio del departamento de Protección de Alimentos de DILAVE-MGAP, que cuenta con el equipamiento necesario y el personal con experiencia bacteriológica en el cultivo de los agentes en estudio. En la etapa preparatoria y durante el desarrollo del proyecto, concurrió al Uruguay la Dr. Doreene Hyatt (Jefa de Bacteriología del Laboratorio Veterinario de CSU) quien

entrenó al personal en las técnicas de aislamiento utilizadas ya que se introdujo en el país la técnica de perlas inmuno-magnéticas para mejorar la sensibilidad de los aislamientos de este agente. Se procesaron las muestras trabajando con pools de hasta 5 muestras con la excepción de los primeros 6 establecimientos muestreados donde, por error, se utilizó pools de 10. El uso de pools de muestras permite aumentar el número de animales a estudiar, disminuyendo el número de muestras a procesar por el laboratorio, pudiendo abarcar más establecimientos y permitiendo un mejor uso de los recursos. En un estudio (Kivelä et al., 1998) se comparó el muestreo en pools con muestras individuales para detectar *Salmonella* en ganado, concluyendo que muestras de materia fecal en pools de no más de 20 animales dan resultados seguros para pruebas de tamizaje en predios, con un nivel de concordancia alto entre ambos métodos ($\kappa = 0.98$). En consecuencia el uso de esta metodología no produce mayores alteraciones en los resultados. Si algún pool resultaba positivo, se procedió a procesar las muestras individuales que lo componían.

Protocolo para recuperar *E. coli* O157:H7: se siguió el procedimiento utilizado por el laboratorio de la Universidad Estatal de Colorado, EUA (CSU)

Las muestras fueron colocadas en una bolsa estéril con caldo de enriquecimiento para Gram negativos modificado (Difco 0486-17-4 Detroit, Michigan), en el que se suspende 39 gramos de caldo gram negativo (GN) en 1 litro de agua desionizada, calentando hasta disolver completamente y se autoclava por 30 minutos, en un medio que contiene en un litro: 0.05 ml de Cefixime, 10 mg de Cefsulodin, 8 mg de Vancomicina.

Así, las muestras de materia fecal se suspendieron (10% p/v) en ese caldo, poniéndose en el stomacher durante 30 segundos, incubándose luego por 6 horas a 37° C. Luego las muestras fueron removidas del incubador y leídas por separación inmunomagnética. Para esto último se tomaron alícuotas de 1 ml de la suspensión, colocándose en un tubo de microcentrífuga añadiendo 20 μ l de microesferas magnéticas recubiertas por anticuerpos monoclonales anti-*e.coli*O157 (Dynaset, Oslo, Norway), se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó con solución tampón fosfato (PBS) con 0.05% Tween 20. Luego de tres ciclos de resuspensión, se hizo la separación magnética y se lavó. 50 μ l de la suspensión de microesferas se pusieron en sorbitol MacConkey agar con el cefixime y telurito de potasio (SMACT). El inóculo se distribuyó en forma homogénea con un hisopo estéril en la mitad de la placa y la otra mitad fue sembrada por estrías. Se incubó 18 hs a 37° C. *E. coli* O157:H7, no fermenta el sorbitol a diferencia de otras cepas del mismo género que si lo hacen. Es por esto que se tomaron de la placa CT Sorbitol Mac Conkey (SMACT) las colonias que no expresaron ningún color, generalmente blancas con centro gris (sorbitol negativas), las cuales se diferenciaron del sorbitol positivo ya que estas últimas presentaron una coloración rosada. Las colonias sorbitol negativas fueron testadas por medio de técnicas convencionales como la prueba de indol. Se toma una colonia sospechosa y se siembra en una de las ocho divisiones de la placa de agar sangre y en una de las ocho divisiones de una placa con azul metilene eosina (EMB) y se incuba por 24 hs. Las colonias sospechosas adquieren un brillo verde metálico o un color púrpura oscuro en el medio EMB. Se realizó la identificación por medio de *E. coli* O157:H7 Remel Latex test, para poder determinar si dichas colonias son serogrupo O157 y/o H7. Esta prueba tiene la ventaja de excluir falsos positivos, los cuales a diferencia de los positivos verdaderos no aglutinan si se les hace previamente un tratamiento calórico. Además las colonias

que no presenten motilidad luego de 3 pasajes por un medio semi-sólido son definidas como no móviles (H-)

Se realizaron 20 controles de calidad para establecer los niveles de detección de las pruebas utilizadas, según los protocolos de la CSU para separación inmunomagnética para asegurarse de que el laboratorio sea capaz de detectar muestras positivas y determinar la sensibilidad del protocolo. Así, la noche anterior se preparaba el inóculo de *E. coli* inoculando una colonia pura de un aislamiento conocido en medio de crecimiento no selectivo y se incubaba toda la noche. Al otro día se procedía a las diluciones y su posterior inoculación en cajas de Petri con agar no selectivo, incubándose toda la noche, para contar las colonias al otro día, calculando las unidades formadoras de colonia por ml. Ese segundo día se procedía a inocular una muestra conocida como negativa con cuatro de las diluciones obtenidas del inóculo conocido como positivo. Se identificaban de modo que el personal no pudiese distinguir las muestras, éstas se mezclaban y se incubaban para ser procesadas al otro día y se comparaban los resultados obtenidos a partir de las diluciones de la colonia pura y de las colonias obtenidas luego de la inoculación de la muestra negativa.

III. RESULTADOS

En la tabla II se resumen los mismos datos de la tabla I, pero después de proceder a la exclusión de los establecimientos con menos de 30 novillos de 3 años o más. Se observó que se excluyeron el 93% de los establecimientos, pero se mantuvo el 87% de la población objetivo: novillos de 3 años o mayores.

Tabla II. Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento, luego de la exclusión de los establecimientos con menos de 30 cabezas de novillos de 3 años o más. DICOSE 2001

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Novillos por edad		
			≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	236.009	249	53.809	29.283	22.266
Canelones	24.774	59	8.202	3.484	2.903
Cerro Largo	311.036	316	58.518	39.514	32.940
Colonia	29.752	57	6.616	5.025	5.893
Durazno	283.996	280	59.215	35.911	30.669
Flores	127.961	110	21.093	16.969	12.519
Florida	191.871	209	38.480	23.736	16.965
Lavalleja	176.815	242	39.782	20.089	17.524
Maldonado	36.643	73	9.558	4.961	3.649
Paysandú	191.457	205	43.419	25.135	20.733
Río Negro	138.508	110	19.478	22.011	17.089
Rivera	183.444	198	33.453	18.620	16.809
Rocha	174.768	152	26.223	23.623	22.595
Salto	222.222	201	42.058	28.589	21.377
San José	36.910	40	5.750	4.679	6.435
Soriano	114.796	120	23.118	26.134	19.439
Tacuarembó	366.737	365	78.674	43.202	34.518
Treinta y Tres	154.216	132	22.981	16.629	14.299
Total	3.001.915	3.118	590.427	387.594	318.622
% del total previo a la exclusión	28%	7%	87%	46%	31%

En la tabla III se observa la composición de los diferentes estratos en el marco de muestreo y los tamaños de muestra obtenidos los cuales fueron considerados en el análisis para la determinación de los pesos de ponderación.

Tabla III. Número de establecimientos según giro de producción, establecimientos muestreados y porcentaje de muestreo

Giro	Frecuencia	Muestra	Porcentaje
Ganaderos	3071	97	3%
Lecheros	34	23	68%
Feedlot	14	13	93%
TOTAL	3119	133	4%

En la figura 1 se observa la distribución de los establecimientos en el territorio del Uruguay según el sistema de información geográfico.

Figura 1. Establecimientos ganaderos muestreados según el tipo de producción.



En la tabla IV se pueden observar los datos globales descriptivos del muestreo para *E. coli* O157:H7, tanto a nivel individual como de establecimientos productores.

Tabla IV. Resultado del muestreo para *E. coli* O157:H7 Pooles, Establecimientos y Novillos muestreados, procesados y resultados.

Giro	Pooles		Novillos		Establecimientos	
	n	+	N	+	n	+
Feedlot	119	0	670	0	13	0
Pasturas	871	0	4376	0	97	0
Lechería	193	1	962	1	23	1
TOTAL	1183	1	6008	1	133	1

No hay una correspondencia absoluta entre la cantidad de pooles, novillos y establecimientos, porque erróneamente se procesaron las muestras de los primeros predios en pooles de diez muestras cada una, en lugar de las cinco que hubiese correspondido, y en algunos establecimientos había menos de 50 animales a muestrear.

En la tabla V se describe el número de establecimientos muestreados realizado en cada uno de los meses del año. En los meses de junio y julio aparecen sumados los

predios muestreados en 2002 y 2003, debido a que no pudo cumplirse estrictamente con el cronograma de actividades programado, lo que supuso la extensión del período de trabajo a catorce meses.

Tabla V. Número de establecimientos muestreados realizados según mes del año

mes	neg	pos	total
Enero	9	0	9
Febrero	6	0	6
Marzo	11	1	12
Abril	8	0	8
Mayo	9	0	9
Junio	19	0	19
Julio	19	0	19
Agosto	11	0	11
Setiembre	13	0	13
Octubre	10	0	10
Noviembre	9	0	9
Diciembre	8	0	8
Total	132	1	133

Los datos individuales proyectados a la población en función del diseño utilizado nos muestran que la prevalencia esperada (número de bovinos con presencia del agente) sería de 0,008% con un error estándar de 0,008% (Tabla VI). Si observamos la distribución por estratos vemos que el agente no se detectó ni en los feedlot, ni en los animales sobre pasturas y tiene una prevalencia esperada de 1,26% con un error estándar de 1,24% en animales del estrato lechero.

Tabla VI. Estimaciones de prevalencia de bovinos positivos para E. coli O157:H7, total y por giro de actividad.

pweight:	peso	Number of obs	=	6008	
Strata:	giro	Number of strata	=	3	
PSU:	farm	Number of PSUs	=	133	
		Population size	=	545268.82	

Mean	Subpop.	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	Deff

ec_157					
	Feedlot	0	0	0	0
	Pasturas	0	0	0	0
	Lecheria	.0126468	.0123641	-.0118142	.0371077

	T o t a l	.0000759	.0000762	-.0000749	.0002267

Discriminando por estrato aparecen los feedlot y las pasturas como negativos, y entonces la prevalencia a nivel de establecimientos que producen en el giro lechero es de $4,00\% \pm 4,00\%$, tal como se muestra en la Tabla VII.

Tabla VII Estimaciones de prevalencia establecimientos positivos para *E. coli* O157:H7, total y por giro de actividad.

pweight:	peso	Number of obs	=	133
Strata:	giro	Number of strata	=	3
PSU:	<observations>	Number of PSUs	=	133
		Population size	=	3057.6369

Mean	Subpop.	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	Deff	
f_ec157						
	Feedlot	0	0	0	0	
	Pasturas	0	0	0	0	
	Lecheria	.04	.04	-.0391352	.1191352	.0664765
T O T A L		.0004835	.0004835	-.000473	.0014399	.0638483

Analizados globalmente estos datos podemos afirmar con un 95% de confianza que la prevalencia en novillos prontos para la faena es menor o igual a $0,008\% \pm 0,008$. Por el lado de los establecimientos con una confianza del 95% podemos afirmar que la prevalencia es menor o igual a $0,05\% \pm 0,05$.

El aislamiento obtenido fue referido al Centro Nacional de Referencia (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de la República) donde se confirmó y se caracterizó como VT1/VT2 (productora de verotoxinas 1 y 2), Hly-A+ (con hemolisina), *eae* + (con el gen *eae*) y Biotipo C (rafinosa +, dulcitol+, ramnosa +, sorbitol -, β -glucoronidasa -, según biotipificación propuesta en manual de Procedimientos del Ministerio de Salud, Argentina, 2000).

IV. DISCUSION.

Se logró alcanzar una cobertura nacional, tal como estaba propuesto, consiguiendo obtener representatividad de la población objetivo “novillos próximos a la faena” a través del método de muestreo utilizado. La cobertura de los feedlot fue prácticamente total, salvo un productor que se negó a participar. El método de muestreo permitió alcanzar una buena representación de los establecimientos típicos de producción de carne sobre pasturas y de aquellos dedicados a la producción de leche que tienen como actividad complementaria engordar novillos para faena. Sólo se detectó un establecimiento con animales positivos en el estrato de animales de origen lechero. En la comparación de las frecuencias halladas en estudios

realizados en otros países y momentos se debe tener en cuenta en primer lugar los métodos de laboratorio utilizados. Se propuso como uno de los factores más influyentes en las bajas prevalencias encontradas en algunos trabajos la baja sensibilidad de las técnicas empleadas en la detección de *E. coli* O157 (Meyer-Broseta et al., 2001). En la revisión realizada por Meyer-Broseta et al. (2001) en ganado sano se resume la prevalencia encontrada como menor a 1% en la mayoría de los casos y nunca mayor a 5%, con una proporción de rodeos eliminando *E. coli* O157 que variaba entre un 0% y un 100%. La prevalencia estimada de 0 a 3% individual obtenida en los primeros estudios a principios de la década de los 90 hasta el rango de 0 a 6.1% con técnicas más sensibles, y cambia si se estudian establecimientos previamente identificados como positivos o si se llega a ellos rastreando el origen de casos humanos a 1.3 hasta 9.5%, como lo evidencia el USDA, manejando varios trabajos en Estados Unidos y Europa desde 1986 (USDA:APHIS:VS:CEAH, 1997). La misma fuente indica que los estudios longitudinales muestran prevalencias mayores, en un rango de 22 a 100%, lo que se explicaría por la colonización transitoria de los animales, con una duración media de excreción de la bacteria menor a 30 días (Besser et al., 1997; Shere et al., 1998). Resultados similares referidos a la disímil prevalencia encontrada y las razones de ello surgen de otro estudio comparativo (Blanco et al., 2001).

Los métodos de preenriquecimiento ya habían mostrado ser preferibles a la siembra directa (McDonought et al., 2000). El método empleado en nuestro trabajo, de enriquecimiento selectivo y técnicas de separación inmunomagnética (IMS) es el propuesto por varios autores (Okrend et al., 1992; Chapman et al., 1997). Estas técnicas permitirían detectar cargas bacterianas tan bajas como un microorganismo por gramo de materia fecal (Heuvelink et al., 1998 a y b) y se ha comparado con otros métodos, confirmando su mayor sensibilidad (Chapman et al., 1994; Sanderson et al., 1995; Karch et al., 1996; Elder et al., 2000). En consecuencia se encontraron prevalencias mayores con la técnica de IMS (Van Donkersgoed et al., 1999; Gansheroff et al., 2000; Dunn et al., 2004), lo que lleva a suponer que la muy baja prevalencia encontrada en nuestro trabajo no se puede explicar por falta de sensibilidad de la técnica de laboratorio empleada.

Los factores estacionales han sido considerados en países de clima templado, y se ha visto un aumento en la frecuencia de los hallazgos del agente en animales durante los meses de verano (Chapman et al., 1997; Van Donkersgoed et al., 1999), mencionándose factores climáticos como temperatura, lluvias, fotoperíodo, así como factores de manejo. La misma tendencia se observa en casos clínicos en humanos, postulándose una serie de razones para ello, como el manejo de los alimentos, su tipo, cocción y comida fuera de casa (Boyce et al., 1995). Meyer-Broseta sugiere que estos son factores confundentes (Meyer-Broseta et al., 2001). Sin embargo, la similitud de patrones estacionales encontrados en ganado, cortes de carne al menudeo y la incidencia en humanos, provee fuerte evidencia de la existencia de relación entre colonización del ganado y la presencia de la enfermedad en humanos (Hancock et al., 2001). En nuestro estudio el muestreo se extendió en todos los meses del año, buscando disminuir la incidencia que estos factores puedan tener sobre la frecuencia de los aislamientos. Concentrar el trabajo en los meses cálidos, podría hacer aumentar la prevalencia de *E. coli*; en algunas oportunidades se realiza la toma de muestras en épocas donde es más factible encontrar *E. coli* (Nielsen et al., 2002; Sargeant et al., 2003; Sargeant et al., 2004; Paiba et al., 2003), en este caso se prefirió no sesgar la muestra para tener una estimación que sirviera como referencia para el Uruguay.

La escasa cantidad del patógeno que se presenta en las heces ha sido mencionado como una dificultad para hallarle, sumado a su desigual distribución. La concentración varía entre 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo (Zhao et al., 1995). La técnica IMS permite detectar con un 95% de confianza a un animal que elimina 5 UFC por gramo (Omisakin et al., 2003). Igualmente, hay que considerar que en la actualidad se indica que en vista que la mayoría del ganado excreta menos de 10^2 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces, la mayoría de los estudios, incluyendo aquellos que emplean IMS, probablemente subestimen la prevalencia de *E. coli* O157 en el ganado (LeJeune et al., 2006). Asumiendo como cierta la conclusión de LeJeune (2006) igualmente se puede afirmar que se utilizó el método más sensible de los disponibles y que por lo tanto de haberse subestimado la prevalencia esto no incide en el momento de comparar resultados con otros investigadores.

En este trabajo se tomaron muestras directamente de la ampolla rectal, con la excepción del muestreo en feedlots, donde el material se obtuvo del piso del corral, siempre en una cantidad que superaba en todos los casos los 30 gramos. Mientras, en otros estudios las cantidades varían desde 0.1 gramos obtenidas por hisopado rectal (Hancock et al., 1994; Hancock et al., 1998) hasta los 20 gramos (Heuvelink et al., 1998 a y b). La concentración y distribución de *E. coli* en las heces es muy variable (Pearce et al., 2004), presumiblemente por la localización de la bacteria en el tracto intestinal de los animales (Naylor et al., 2003), pero la cantidad tomada como muestra en cada animal busca disminuir ese inconveniente.

En nuestro trabajo se tomaron muestras de novillos terminados, como en otros estudios (Wells et al., 1991; Hancock et al., 1994; Heuvelink et al., 1998 b), mientras que otros relevamientos incluyeron otras categorías de animales, lo que debe ser tenido en cuenta cuando se realizan comparaciones entre ensayos, máxime cuando se ha informado que los animales jóvenes son más propensos a contener *E. coli* y ser fuente de contaminación (Griffin & Tauxe, 1991; Wells et al., 1991; Hancock et al., 1994; Zhao et al., 1995; Garber et al., 1995; Shinagawa et al., 2000). La disminución de la prevalencia con la edad se pone de manifiesto en estudios longitudinales (Hancock et al., 1998), intentándose explicar la variación poniendo de manifiesto los cambios que suceden en el tracto digestivo de los rumiantes, en la dieta, la resistencia a infecciones o aspectos de manejo que aumentan la oportunidad de una colonización inicial de rumen y colon con *E. coli* (Meyer-Broseta et al., 2001). Los factores inmunológicos parecen no jugar un papel importante ya que se ha visto que no hay asociaciones entre títulos serológicos, eliminación de la bacteria y reinfección (Johnson et al., 1996; Besser et al., 1997). Se prefirió muestrear animales en terminación por el hecho de que al estar más próximo al final de la cadena cárnica, era más relevante para la salud del consumidor y como valor agregado al producto final.

En ocasiones la selección de los animales se basa en la conveniencia, la voluntad de participar (Hancock et al., 1998), o se realiza en establecimientos donde se ha encontrado previamente *E. coli* (Heuvelink et al., 1998 a). Aquí, los establecimientos ganaderos y los animales fueron elegidos aleatoriamente, por lo cual los resultados obtenidos tienen representatividad estadística y el máximo valor epidemiológico.

También influye el tipo de diseño del estudio, al momento de comparar los resultados. Se han llevado adelante estudio caso-control (Zhao et al., 1995), estudios longitudinales (Shere et al., 1998; Hancock et al., 1998), además de los transversales como el nuestro. La duración de la excreción de *E. coli* en heces fue estimada en

menos de 30 días para la mayoría de los bovinos (Besser et al., 1997), lo que podría hacer que este tipo de diseño arroje menores frecuencias de hallazgos del patógeno. La mayoría de los estudios utiliza este diseño, si bien muestra algunas desventajas y limitaciones que no lo hacen ideales para estudios de enfermedades de baja frecuencia o donde la duración de la infección es demasiado corta como es el caso de *E. coli*, además de no poder controlar adecuadamente las variables y no poder deducir relaciones temporales entre los factores de riesgo y la enfermedad (Thrusfield, 1990; Martin et al., 1997). Sin embargo, es un diseño sumamente útil para establecer un estado de situación y generar hipótesis (Meyer-Broseta et al., 2001), que es uno de los objetivos del presente trabajo.

Hay diferencias en el tamaño de los rodeos, ya que en general el promedio de vacunos en los establecimientos son mayores en Estados Unidos que en Europa, y la diferencia se mantiene si comparamos con la realidad del Uruguay. En EUA, Faith et al. (1996) encuentran en predios positivos un número de animales en un rango de 134 a 274, y Hancock et al. (1998) informan de una mediana de 900 animales en los predios participantes. Esto hace que no se deban extrapolar conclusiones sin tener en cuenta estas diferencias (Meyer-Broseta et al., 2001). Nielsen et al. (2002) no encontraron influencia del tamaño del rodeo en la prevalencia en ningún ensayo estudiado.

La importancia del ambiente ha sido puesta de manifiesto en repetidas ocasiones, demostrándose la persistencia de las mismas cepas en el predio por largos períodos (Shere et al., 1998). Animales mantenidos en pasturas en meses de verano no albergaban *E. coli*, mientras que sí lo hacían los que permanecieron confinados, según se reporta en un estudio realizado en Suecia (Jonson et al., 2001), quizá por el mayor contacto entre estos últimos animales. La transmisión horizontal se ha propuesto como medio de transmisión para mantener la contaminación (Cobbold & Desmarchelier, 2002; Faith et al., 1996). Los animales estabulados mostraron tasas de excreción de *E. coli* mayores (Synge & Paiba, 2000). La explotación a campo abierto en nuestro país haría más difícil ese contacto, por lo cual la tasa de infección debería ser menor, como la hallada en nuestro trabajo.

No se ha establecido una clara asociación entre la dieta y la eliminación de STEC en el ganado. Algunos autores opinan que dietas ricas en grano inducen mecanismos que facilitan la resistencia de STEC a la acidez, favoreciendo su supervivencia en el tracto digestivo y su excreción a través de la materia fecal, aumentando el riesgo de producir enfermedad en el hombre al facilitar el pasaje de la bacteria a través del estómago (Diez-González et al., 1998), e incluso proponen alimentar con heno a los animales previo a su envío a faena (Russel et al., 2000). Estas conclusiones no son compartidas por otros, quienes incluso refutan las recomendaciones ofrecidas (Hancock et al., 1999), invocando mecanismos innatos para resistir la acidez. Otros estudios muestran que animales alimentados con heno eliminan *E. coli* durante más tiempo, y que la bacteria es igualmente resistente a la acidez con independencia de la dieta previa (Hovde et al., 1999). Esto último fue también demostrado en otro ensayo, tomando material de diferentes zonas del tracto digestivo (Grauke et al., 2003). Modelos experimentales en ovinos muestran mayor eliminación de *E. coli* en animales alimentados con heno (Kudva et al., 1997). Algunos componentes de la dieta han sido involucrados como factores predisponentes a facilitar la colonización del tubo digestivo del ganado, como la cebada (Dargatz et al., 1997), pulpa de remolacha, silo de maíz (Herriot et al., 1998), mientras que otros ejercerían efecto contrario, como la semilla de algodón (Hancock et al., 1994; Dargatz et al., 1997; Buchko et al., 2000), heno de trébol, maíz molido (Buchko et al., 2000) o harina de

soja (Garber et al., 1995). La mayoría del ganado en Uruguay tiene como base de su dieta las pasturas, existiendo la complementación alimentaria en el ganado lechero y una alimentación más intensiva en los feedlots, por lo cual los factores de riesgo asociados a la dieta no tendrían mayor relevancia.

El manejo de los efluentes y el uso de estiércol como fertilizante que han sido mencionados como un factor que facilita la infección o reinfección de los animales (Kudva et al., 1998; Jian et al., 2002), no son práctica común en Uruguay.

En estudios de gran alcance realizados en feedlots de USA, que incluyeron 13 estados se constató que la probabilidad de encontrar un animal positivo era 3.4 veces mayor en los corrales en los que los bovinos habían comenzado a alimentarse desde hacía menos de 20 días (Dargatz et al., 1997), quizá por stress o por falta de alimentación durante el transporte. Esta situación no es común en nuestro país, donde el ganado recorre cortas distancias y permanece en el predio por largos períodos. Los ganados destinados a invernada, generalmente superan los 300 kilos de peso, lo que sería un factor negativamente asociado a la tasa de frecuencia de aislamientos de *E. coli* (Dargatz. et al., 1997), ya que esos animales enfrentarían mejor los factores tensionales del transporte y nuevo ambiente.

A pesar de que Argentina manifiesta altas tasa de HUS, los aislamientos de *E. coli* O157:H7 son raros (López et al. 1989). En un amplio estudio se caracterizaron 153 cepas de STEC aisladas de heces bovinas y de carne vacuna picada y hamburguesas en Argentina, encontrando que el 14% de los aislamientos presentaba *stx1*, 74% *stx2* y 12% ambos genes (Blanco et al. 2004). Además los genes de virulencia para la intimina *eae* se detectaron en el 24% de las muestras y el 46% la *ehxA* que codifica para la hemolisina. La cepa hallada en el presente estudio fue caracterizada como VT1/VT2, Hly-A positiva, con el gen *eae* y Biotipo C, lo que muestra ciertas similitudes con el trabajo citado precedentemente.

El ganado lechero no muestra diferencias con ganado de carne en varios trabajos. Así se ha visto que tanto era un poco mayor 16.1% vs 13.4% (Chapman et al. 1997) como que resultaba un poco menor 0.28% vs 0.71% en animales, 8.3% vs 16% (Hancock et al. 1994), según los ensayos. Las diferencias tampoco se han marcado en revisiones de prevalencia realizadas. (USDA 1997; Meyer-Broseta et al. 2001). Se ha propuesto la hipótesis de que el aumento en la prevalencia de infecciones humanas con *E. coli* es la emergencia de un nicho ecológico para el patógeno en el ganado lechero (Garber et al, 1995), implicando factores nutritivos que alteran el tracto gastrointestinal desde los primeros días de vida de los terneros, asociado a raciones de inicio así como compartir utensilios y el agrupamiento de animales. En nuestro estudio la estimación puntual, para el giro lechero, así como el error de la misma es muy alta (4,0% \pm 4,0%) debido al pequeño tamaño de la muestra, pero no muestra diferencias estadísticas con los otros tipos productivos. La estimación más pesimista que se podría obtener, se alcanza considerando sólo al estrato lechero, en cuyo caso la prevalencia observada es de 1,26% con un error de 1,24%.

V. CONCLUSIONES

Este estudio permite concluir que la prevalencia del agente en estudio es relativamente muy baja en los establecimientos ganaderos por lo cual si el procesamiento en la cadena de producción de carne es adecuado el riesgo para el consumidor es no significativo. Estos resultados son un insumo para un potencial análisis de riesgo de los productos cárnicos del Uruguay.

Si bien, es el primer estudio acerca de la presencia y frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157:H7 en el país, la baja prevalencia encontrada por medio de una

metodología que cumple con requerimientos que brindan confiabilidad a los resultados obtenidos, supone un valor agregado para las carnes bovinas producidas en las condiciones características del Uruguay. Esto es aún más evidente si se comparan los valores resultantes de este estudio con los conseguidos en trabajos de diferentes regiones del mundo.

En consecuencia, los datos obtenidos son un primer aporte para intentar posicionar el producto final de la cadena cárnica en una categoría de bajo riesgo en lo referente a la inocuidad alimentaria en general, y a la presencia de *E. coli* O157:H7, en particular, motivo de preocupación en incremento en los consumidores, a nivel global

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Armstrong G. L., Hollingsworth J., Morris J. G. J. (1996) Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developing world, *Epidemiol. Rev.*, 18: 29–51.
2. Besser T. E., Hancock D.D., Pritchett L. C., McRae E. M., Rice D. H., Tarr P. I. (1997). Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Infect. Dis.* 175:726–729
3. Beutin L., Geier D., Steinbrück H., Zimmermann S., Scheutz F.(1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2483-2488
4. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. (2001). Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Ed. Duffy,G. Garvey, P. McDowell, D.A. Food & Nutrition Press. Inc., Trumbull, CT, USA.pp113-148
5. Blanco M., Padola N.L., Krüger A., Sanz M. E., Blanco J.E.,González E.A., Dahbi G., Mora A., Bernárdez M.I., Etcheverría A.I., Arroyo G.H., Lucchesi P.M.A., Parma A.E., Blanco J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 7: 269-276.
6. Boyce T. G., Swerdlow D. L., Griffin P. M. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N.Engl.J.Med.* 333:364-368
7. Buchko S.J., Holley R.A., Olson W.O., Gannon V.P.J., Veira D.M. (2000). The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 by steers. *J. Food Prot.* 63: 1467-1474.
8. Cerqueira A.M.F., Guth B.E.C., Joaquim R.M., Andrade J.R.C. (1999). High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 70: 111-121
9. Cobbold R., Desmarchelier P. (2002). Horizontal transmission of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.*68: 4148-4152
10. Cray W.C. Jr. & Moon H.W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586-1590

11. Chapman P. A., Siddons C. A., Cerdan Malo A. T., Harkin M. A. (1997). A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol. Infect.* 119:245–250
12. Chapman P.A., Siddons C.A., Wright D.J., Norman P., Fox J., Crick E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in man. *Epidemiol. Infect.* 111, 439–447.
13. Chapman P.A., Wright D.J., Siddons C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin producing *Escherichia coli* from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 40: 424-427
14. Chinen I., Otero J.L., Miliwebsky E.S., Roldán M.L., Baschkier A., Chillemi G.M., Nóboli C., Frizzo L., Rivas M. (2003). Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Res. Vet. Sc.* 74: 283-286
15. Chinen, I. Tanaro, J.D. Miliwebsky, E. Lound, L.H. Chillemi, G. Ledri, S. Bashkier, A. Scarpin, M. Manfredi, E. Rivas, M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J. Food Prot.* 64: 1346-1351
16. Dagartz D.A. & Hill G.W. (1996). Analysis of survey data. *Prev. Vet. Med.* 28: 225-237
17. Dargatz, D.A., Wells, S.J., Thomas, L.A., Hancock, D.D., Graber, L.P., 1997. Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in feces of feedlot cattle. *J. Food Prot.* 60, 466–470
18. Diez-Gonzalez, F. Callaway, T.R. Kizoulis, M.G. Russell J.B. 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science* 281: 1666-1668
19. Dunn, J.R. Keen, J.E. Thompson, R.A. 2004. Prevalence of shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in adult dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224: 1151-1158.
20. Elder, R. O. Keen, J. E. Siragusa, G. R. Barkocy-Gallagher, G. A. Koohmaraie, M. Laegreid, W. W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:2999-3003.
21. Elliott, E.J. Robins-Browne, R.M. O’Loughlin, E.V. Bennett-Wood, V. Bourke, J. Henning, P. Hogg, G.G. Knight, J. Powell, H. Redmond, D. 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch. Dis. Child* 85:125–131
22. Faith, N. G., Shere, J. A. Brosch, R. Arnold, K.W. Ansay, S. E. Lee, M. S. Luchansky, J. B. Kaspar, C.W. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1519–1525
23. Funk, J. A. Davies, P. R. Nichols, M.A. 2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 412-418
24. Gadea, M.P. Varela, G. Bernadá, M. Sirok, A. Mota, M.I. Sabelli, R. Grotiuz, G. Schelotto, F. Chinen, I. Chillemi, G. Rivas, M. 2004. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Rev Med Uruguay* 20:79-81

25. Galland, J.C., Hyatt, D.R., Crupper, S.S., Acheson, D.W., 2001. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1619–1627
26. Gansheroff, L.J. O’Brien, A.D. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: Higher prevalence rates than previously estimated. *Proceedings of the National. Academy of Science USA*, Vol. 97: 2959-2961
27. Garber, L. P. Wells, S.J. Hancock, D. D. Doyle, M. P. Tuttle, J. Shere, J. A. Zhao, T.. 1995. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:46–49.
28. Gil, A. Verdier, M. Alves, J. Pigurina, G. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 en carnes rojas y estimación del riesgo en Uruguay. Instituto Nacional de Carnes. Dirección de Servicios Técnicos a la Cadena Agroindustrial, pp1-9.
29. Giraldi, R. Guth, B.E.C. Trabulsi, L.R. 1990. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1460-1462
30. Grauke, L.J. Wynia, S.A. Sheng, H.Q. Yoon, J.W. Williams, C.J. Hunt, C.W. Hovde, C.J. 2003. Acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 from the gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. *Vet. Microbiol.* 95: 211-225
31. Griffin P. M., Tauxe R.V.(1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 13 :60–98.
32. Guth, B.E.C. Chinen, I. Miliwebsky, E. Cerqueira, A.M.F. Chillemi, G. Andrade, J.R.C. Baschkier, A. Rivas, M. 2003. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. *Vet. Microbiol.* 92: 335-349
33. Hancock D.D. Besser T.E. Gill C. Hovde-Bohach C. (1999). Cattle, hay and *E. coli*. *Science* 284: 51-52
34. Hancock, D. D., Besser T. E, Kinsel M. L., Tarr P. I., Rice D. H., Paros M. G.. (1994). The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington state. *Epidemiol. Infect.* 113:199–207
35. Hancock D.D., Besser T. E., LeJeune J., Davis M., Rice D. H.(2001). The control of VTEC in the animal reservoir. *Int.J.Food Microbiol.* 66:71-78.
36. Hancock, D.D., Besser T. E., Rice D. H., Ebel E.D., Herriott D. E., Carpenter L. V (1998). Multiple sources of *Escherichia coli* O 157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35: 11-19
37. Hancock, D. Rice, D. Herriott, D. Besser, T. Ebel, E. Carpenter, L. 1997. The effect of farm manure handling practices on *Escherichia Coli* O157 prevalence in cattle. *J. Food Prot.* 60:363-366
38. Herriott D. E., Hancock D. D. ,Ebel E. D., Carpenter L. V., Rice D. H., Besser, T. E. (1998). Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *J. Food Prot.* 61: 802-807.
39. Herriott, D. E. Hancock, D. D. Ebel, E. D. Carpenter, L. V. Rice, D. H. Besser, T. E. 1998. Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by Shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *J. Food Prot.* 61: 802-807.
40. Heuvelink, A.E. van der Biggerlaar, F.L.A.M. de Boer, E. Herbers, R.G. Melchers, W.J.G. Huis In ’t veld, J.H.J. Monnens, L.A.H. 1998 a. Isolation and

- characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. J. Clin. Microbiol. 36:878-882
41. Heuvelink, A.E. van der Biggerlaar, F.L.A.M. Zwartkruis-Nahuis J.T.M. Herbers, R.G. Huyben, R. Nagelkerke, N. Melchers, W.J.G. Monnens, L.A.H. de Boer, E. 1998 b. Occurrence of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 on Dutch Dairy Farms. J. Clin. Microb. 36: 3480-3487.
 42. Hovde, C.J. Austin, P.R. Cloud, K.A.. Williams, C.J. Hunt C.W. 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. Appl. Environ. Microbiol.65: 3233-3235
 43. Irino, K. Vaz, T.M.I. Naves, Z.V.F. Lara, R.R. Marco, M.E.C. Rocha, M.M.M. Moreira, T.P. Gomes, T.A.T. Guth, B.E.C. 2002. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 8, 446-447
 44. Jiang, X. Morgan, J. Doyle, M.P. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. . Appl. Environ. Microbiol. 68: 2605-2609.
 45. Johnson, R.P. Cray, W.C. Johnson, S.T. 1996. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7 Infect. Immun. 64: 1879-1883.
 46. Karch, H. Janetzki-Mittmann, C. Aleksic, S. Datz M. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. J. Clin. Microbiol. 34: 516-519
 47. Kivelä, S.L. Ruoho, O., Seun E., Hintikka E-L (1998). Pooles faecal samples compared with individual samples for detection of Salmonella in cattle. Proc. XX Congreso Mundial de Buiatría. 6-10 de julio, Sidney, Australia
 48. Kudva, I.T. Blanch, K. Hovde, C.J. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure or manure slurry. Appl Environ Microbiol 64: 3166-3174
 49. Kudva, I. T., Hunt, C. W., Williams, C. J., Nance, U. M. Hovde, C. J. 1997. Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. Appl Environ Microbiol 63:3878-3886
 50. LeJeune J.T., Hancock D.D., Besser T.E. (2006). Sensitivity of *Escherichia coli* O157 detection in bovine feces assessed by broth enrichment followed by immunomagnetic separation and direct plating methodologies. J. Clin. Microbiol. 44: 872-875
 51. López E.L. Díaz M., Grinstein, S. Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE (1989). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentina children : the role of Shiga-like toxins. J Infect Dis 160: 469-475
 52. Mainil, J.G. Daube, G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and food: who's who? J. Appl. Microbiol. 98: 1332-1344
 53. Martin S., Meek A.H., Willeberg p. (1997). Epidemiología veterinaria. Principios y Métodos. Ed. Acribia, Zaragoza, España
 54. Mattar, S. Vásquez, E. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 infection in Colombia. Letters. Emerg. Infect. Dis. Vol.4 N° 1
 55. McDonough, P.L. Rossiter, C.A. Rebhum, R.B. Stehman, S.M. Lein, D.H. Shin, S.J. 2000. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in the New York State and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. J. Clin. Microbiol. 38: 318-322

56. Mead, P. S. & Griffin, P. M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7, Lancet, 352, 1207–1212.
57. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., y Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607–625.
58. Meyer-Broseta, S., Bastian, S.N., Arne, P.D., Cerf, O., Sanaa, M., 2001. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 347–361.
59. Ministerio de Salud, OPS, CDC. (2000). Diagnóstico de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga, Manual de Procedimientos .Buenos Aires, Argentina, 31 de Mayo al 9 de Junio
60. Moreira, C.N. Pereira, M.A. Brod, C.S. Rodrigues, D.P. Carvalhal, J.B. Aleixo, J.A.G. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 93: 179-183
61. Nataro, J.P. Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli* . *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
62. 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. 2003. Lymphoid follicledense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect. Immun.* 71:1505–1512.
63. Nielsen, E. M. Tegtmeier, C. Jørgen Andersen, H. Grønbaek, C. Andersen, J.S. 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet. Microb.* 88: 245-257
64. Ogden I.D., MacRae M., Strachan N.J.C.(2004). Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal? *FEMS Microbiology Letters* 233 : 297–300
65. Okrend A.J.G., Rose B.E., Lattuada C.P. (1992). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads. *J. Food Prot.* 55: 214-217.
66. Omisakin F., MacRae M., Ogden I. D., Strachan N. J. C. (2003). Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2444-2447.
67. Padola N.L., Sanz M.E., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Etcheverría A.I., Arroyo G.H., Usera M.A., Parma A.E.(2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100: 3-9
68. Paiba G.A., Wilesmith J.W., Evans S.J., Pascoe J.S., Smith R.P., Kidd S.A., Ryan J.B., McLaren I.M., Chappell S.A., Willshaw G.A., Cheasty T., French N.P., Jones T.W.H., Buchanan H.F., Challoner D.J., Colloff A.D., Cranwell M.P., Daniel R.G., Davies I.H., Duff J.P., Hogg R.A.T., Kirby F.D., Millar M.F., Monies R.J., Nicholls M.J., Payne J.H. (2003). Prevalence of faecal excretion of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales. *Vet. Rec.* 153: 347-353.
69. Paton J.C.& Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
70. Pearce M. C., Fenlon D., Low J. C., Smith A. W., Knight H. I., Evans J., Foster G., Syngé B. A., Gunn G. J.(2004). Distribution of *Escherichia coli*

- O157 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5737-5743.
71. Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., Mc Gee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L. (1983). Hemorrhagic *colitis* associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Eng. J. of Med.* 308:681-685
 72. Rivas M., Balbi L., Miliwebsky E.S., García B., Tous M., Leardini N., Prieto M., Chillemi G.M., Principi M. (1998). Síndrome Urémico Hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 1-7
 73. Rivero M.A., Padola N.L., Etcheverría A.I., Parma A.E. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 64: 352-356.
 74. Russell J.B., Diez-González F., Jarvis G.N. (2000). Symposium: farm health and safety. Invited review: Effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 863-873.
 75. Sanderson M. W., Gay J. M., Hancock D. D., Gay C. C., Fox L. K., Besser T. E. (1995). Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 33:2616–2619.
 76. Sargeant J.M., Sanderson M.W., Smith R.A., Griffin D.D. (2003). *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle feces and water in four feeder-cattle states en the USA. *Prev. Vet. Med.* 61: 127-135
 77. Sargeant J.M., Sanderson M.W., Smith R.A., Griffin D. (2004). Associations between management, climate, and *Escherichia coli* O157 in the faeces of feedlot cattle in the Midwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 66 :175–206
 78. Shere J.A., Bartlett K.J., Kaspar C.W. (1998). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1390–1399
 79. Shinagawa K., Kanehira M., Omoe K., Matsuda I., Hu D., Widiasih Dan Sugii S. (2000). Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at slaughterhouse in Japan. *Vet. Microbol.* 76: 915-919.
 80. Skinner C.J., Holt D., Smith T.M.F. (editors) (1989). Analysis of complex survey. John Wiley and Sons, New York.
 81. Slutker L., Ries A.A., Greene K.D., Wells J.G., Hutwagner L., Griffin P.M., (1997). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiological features. *Ann. Intern. Med.* 126: 505-513
 82. Smith D., Backford M., Younts S., Moxley R., Gray J., Hungerford L., Milton T., Klopfenstein T. (2001). Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J. Food Prot.* 64, 1899–1903.
 83. StataCorp. (2003). Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: StataCorp LP.
 84. Synge B., Paiba G. (2000). Verocytotoxin-producing *E coli* O157. *Vet Rec* 147 : 27
 85. Thrusfield M. (1990). Epidemiología Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
 86. USDA:APHIS:VS Centers for Epidemiology and Animal Health.(1997). An Update: *Escherichia coli* O157:H7 in Humans and Cattle. Fort Collins, Colorado

87. Van Donkersgoed J., Graham T., Gannon V. (1999). The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. *Can.Vet.J.* 40:332-338.
88. Wells J. G., Shipman L. D., Greene K. D., Sowers E. G., Green J. H., Cameron D. N., Downes F. P., Martin M. L., Griffin P. M., Ostroff S. M., Potter M. E., Tauxe R. V., Wachsmuth I. K.(1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shigalike-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985-989.
89. Zhao T., Doyle M.P., Shere J., Garber L. (1995) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1290-1293.

CAPÍTULO II: SALMONELOSIS

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y está constituido por bacilos gram-negativos, móviles (con unas pocas excepciones), anaerobios facultativos (Acha & Scyfres, 2003). *Salmonella* desarrolla entre 4 y 45 °C y a un pH de 4 a 8, no sobreviviendo a temperaturas de pasteurización. La primera cepa fue descubierta por D. E. Salmon en 1885, en Estados Unidos (Tauxe, 1991), y en 1988 se identificó a *Salmonella* no tifoidea como patógeno humano, luego de un brote en Alemania por consumo de carne proveniente de una vaca moribunda. Hoy se conocen más de 2300 cepas.

Clasificación

La clasificación epidemiológica divide a *Salmonella* en tres grupos : a) las que causan enfermedad sólo en el hombre (*Salmonella* Typhi y *S. Paratyphi*), b) aquellas que lo hacen en ciertos animales, por ejemplo *S. Dublin* en bovinos, *S. Gallinarum* en aves, no siendo común en el hombre, pero cuando aparecen son invasivas y pueden constituir causa de muerte; c) el resto de las cepas, no adaptadas al huésped, causan gastroenteritis generalmente autolimitante, como por ejemplo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* , las dos más importantes cepas de salmonelosis transmitidas del animal al hombre.

La clasificación de *Salmonella* es un factor de discordia que se ha mantenido en los años. Actualmente se considera que existen sólo dos especies dentro del genero *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori* (OIE, 2004). Según características bioquímicas *Salmonella enterica* se subdivide en seis subespecies: *enterica* (antes subespecie I), *salamae* (antes II), *arizonae* (antes IIIa), *diarizonae* (antes IIIb), *houtenae* (antes IV) e *indica* (anteriormente VI). Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serogrupos en base a la presencia de antígenos lipopolisacáridos (O), designándose con una letra, y antígenos proteicos flagelares (H) de acuerdo al esquema Kauffman-White (OIE, 2004). Algunas cepas de *Salmonella* presentan un tercer tipo de antígeno, un polisacárido capsular designado Vi (Ekperigin & Nagaraja, 1998; Salyers & Whitt, 2001). Actualmente se reconocen más de 2500 serovares, nombrados generalmente según el lugar geográfico donde fue aislado por primera vez. Los serovares que causan enfermedades en el hombre pertenecen a la subespecie *enterica*, y generalmente para referirse a un serovar no se indica la subespecie y su nombre no se escribe en itálica. Se utilizan otros métodos para caracterizar los aislamientos, algunos basados en técnicas moleculares (Tenover et al., 1995), permitiendo investigaciones epidemiológicas más detalladas.

Patogenia y enfermedad

Salmonella tiene varios factores de virulencia que producen la diarrea, bacteremia y septicemia, como lo son los pili, el lipopolisacárido de la pared externa, los flagelos, la citotoxina y la enterotoxina (Murray, 1986). *Salmonella* inyecta en la célula huésped proteínas que interrumpen sus funciones, lo que lleva a producir citoquinas y otras señales que atraen polimorfonucleares, los cuales liberan prostaglandinas (Salyers & Whitt, 2001). Así se da inicio a la actividad que lleva a inhibir la toma de sodio y a estimular la secreción de cloro, con la consiguiente pérdida de agua y aparición de la diarrea.

La salmonelosis puede afectar a todas las especies domésticas, siendo los animales preñados y los más jóvenes los más afectados. La manifestación clínica más frecuente es la enfermedad entérica, con diarrea acuosa profusa a veces sanguinolenta y fiebre, aunque se han descrito síntomas muy variados incluyendo septicemia, aborto, artritis, necrosis de las extremidades y enfermedad respiratoria. Muchos animales no presentan signos y constituyen una amenaza para el hombre y otros animales ya que no son detectados como individuos que excretan la bacteria y en consecuencia producen contaminación del ambiente. Según el serovar actuante y la especie animal involucradas, las manifestaciones clínicas varían, así como la duración de la infección los hallazgos postmortem y las pautas epidemiológicas. Algunos serovares sólo afectan a ciertos huéspedes, mientras que otros están adaptados al huésped pudiendo ser fuente de infección para el hombre por contacto directo o por los alimentos. La infección y subsecuente enfermedad clínica es el resultado de la resistencia innata del huésped, la dosis infecciosa, y la infectividad y virulencia de la cepa actuante (Acha & Scyfres, 2003).

En el hombre los síntomas de gastroenteritis aparecen a las 6 a 24 horas de haber ingerido el alimento contaminado y generalmente el cuadro dura menos de una semana (Salyers & Whitt, 2001). Se presentan náuseas y vómitos, seguidos por dolor abdominal y diarrea, y a veces fiebre. Una vez que los síntomas desaparecen las personas pueden seguir eliminando el patógeno durante meses, e incluso un 1 a 3 % se pueden convertir en portadores crónicos.

Impacto de Salmonella

Las infecciones humanas causan importante morbilidad, mortalidad y perjuicios económicos, particularmente en niños, ancianos y personas comprometidas inmunológicamente, constituyendo un desafío para la Salud Pública en el presente y en los próximos años (Tauxe, 1991). A lo anterior hay que agregarle la constatación del incremento en la proporción de *Salmonella* que presenta resistencia a los antimicrobianos.

Las infecciones por *Salmonella* en animales destinados al consumo humano juegan un papel muy importante en la salud pública particularmente en la inocuidad de los alimentos, ya que los productos de origen animal son considerados la principal fuente de infección para el hombre. También la contaminación de la dieta animal es fuente importante de infección para las diferentes especies.

Un análisis de costos efectuados en 1988 estima que se produjeron 12,6 millones de casos de ETA en Estados Unidos, el 84% de los cuales se debe a enfermedades microbiológicas, mayoritariamente salmonelosis con un costo de US\$4.000 millones, correspondiendo a la salmonelosis 2,9 millones de casos que afectaron a todos los sectores de la industria del alimento (Todd, 1989a). En Canadá ocurrían en la misma época más de 600.000 casos al año con un costo de más de 850 millones de dólares (Todd, 1989b). Las enfermedades humanas relacionadas significan un alto costo económico. En EUA el costo anual de ETA causadas por *Salmonella* se estima entre 600 y 3.500 millones de dólares (Buzby et al., 1996).

Otro problema que está aumentando, es la resistencia antibiótica de *Salmonella*, que muchas veces es múltiple y comenzó a ser considerada en un comienzo en Estados Unidos y el Reino Unido (Salyers & Whitt, 2001).

Epidemiología

Se pueden considerar tres períodos definidos en la epidemiología de la infección en el siglo pasado. En el primero hasta 1949, predominó la fiebre tifoidea causada por *S.*

Typhi dentro de las infecciones humanas, y enfermedades producidas por serotipos específicos de huésped en animales, causando severas enfermedades invasivas. En un segundo período, de 1950 a 1969, estas infecciones se volvieron poco frecuentes, y por medidas de salud pública la fiebre tifoidea casi desapareció de los países industrializados, al igual que las salmonelosis más severas en animales por medidas de control. Al mismo tiempo comenzaron a identificarse otras cepas de *Salmonella* no tifoideas como causantes de cuadros de gastroenteritis en el hombre. El período más reciente comenzó en 1970 caracterizado por un marcado incremento de los casos de salmonelosis humana no tifoidea. Surgieron importantes brotes a partir de la ingestión de alimentos, la mayoría de origen animal, en varios países. Muchos serotipos se encontraban en los animales sanos, y además la aparición de resistencia a los antimicrobianos comenzó a aumentar preocupantemente. También caracteriza la presentación de la infección en los últimos años la creciente incidencia del huevo como vehículo del patógeno y la aparición de brotes que involucran gran número de enfermos y en regiones dispersas, como consecuencia en los cambios de hábitos alimenticios de la población que han llevado a la producción centralizada de alimentos.

Aunque primariamente *Salmonella* se considera bacteria intestinal, está ampliamente distribuida en el ambiente y se encuentra comúnmente en diversos materiales contaminados con materias fecales (OIE, 2004). Se ha reconocido en todos los países y aparece como más prevalente en explotaciones intensivas, especialmente aves y cerdos.

La identificación de la cepa actuante en un caso o brote es de suma importancia para la investigación epidemiológica. Así, se emplean métodos bioquímicos y serológicos, la tipificación de fagos y los antibiogramas, las técnicas moleculares del genotipo y el análisis del perfil plasmídico, aunque no todas las cepas llevan un plásmido, o lo pueden adquirir luego o ser de tamaño similar pero genéticamente diferente. También se usan otros métodos como la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y la ribotipificación. Muchas veces hay que recurrir a la combinación de diferentes técnicas en los aislamientos, para lograr una buena diferenciación entre cepas. La detección e identificación es un componente principal en la vigilancia epidemiológica. Los métodos clásicos de diagnóstico son laboriosos y requieren tiempo, por lo cual a veces se demora la toma de decisiones para controlar un brote. Hasta el momento el aislamiento y la identificación de *Salmonella* se realiza mediante métodos de cultivo tradicionales, que implican el pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medios líquidos selectivos, aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos, confirmación bioquímica de las colonias sospechosas y su confirmación serológica. Se están utilizando métodos más rápidos como la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2004). En el área de la microbiología de los alimentos esta técnica se puede utilizar sobre cualquier matriz de alimentos que se desee analizar, tales como muestras de carne o leche.

En animales la presencia de *Salmonella* es más común cuando existen densidades poblacionales altas; en el hombre por ingestión de carne bovina, cerdo, pollo, huevos, productos lácteos, vegetales contaminados y contacto con mascotas, mayoritariamente perros y gatos, además de tortugas, conejos y otros (Pelzer, 1989). La infección por *Salmonella* se mantiene fundamentalmente por la transmisión fecal-oral a animales susceptibles, infectando diversos seres vivos en el ambiente: gato salvajes, perros, roedores, pájaros, moscas, fauna indígena y al hombre. La mayoría de las infecciones son subclínicas, siendo las manifestaciones de la enfermedad la

punta del iceberg, aún cuando se presenta un brote. Los animales septicémicos eliminan el patógeno también por secreciones orales y nasales, orina además de materias fecales, pudiendo no presentar signos clínicos. *Salmonella* posee una relación compleja con el animal huésped, que hace que unos animales estén infectados subclínicamente y otros se enfermen. Estas bacterias son una pequeña parte de un ambiente microbiano dinámico, complejo y competitivo en el tracto intestinal y la competencia es fundamental para resisitir la infección. La flora ruminal es mayormente anaeróbica, y las bacterias coliformes fecales Gram negativas constituyen menos del 1% de la masa bacteriana, de un total de más de 400 especies de bacterias. La mayoría de las bacterias son más sensibles a los antimicrobianos que *Salmonella* por lo que el uso de estos precipita la salmonelosis clínica en animales afectados subclínicamente por permitir o favorecer el sobrecrecimiento de *Salmonella* normalmente no resiste la exposición a los ácidos grasos volátiles (AGV) del rumen funcionalmente normal. (Chambers & Lysons, 1979). Si disminuye el suministro de materia seca, se reduce rápidamente la producción de AGV, permitiendo el crecimiento de *Samonella*, lo que ocurre cuando no hay un acceso regular al alimento como en el transporte, por razones fisiológicas como el parto, por cetosis subclínicas e hipocalcemia, cambios bruscos en la dieta, falta de adaptación al alimento, errores de manejo como el espacio inadecuado en el corral o establo, mezcla de vaquillonas con vacas dominantes en las cercanías del parto. Los lípidos de la ración pueden encapsular *Salmonella* y protegerla de los AGV. *Salmonella* sobrevive por largos períodos bajo las condiciones comunes de un establecimiento ganadero, adaptándose por diferentes mecanismos de sobrevivencia, pudiendo cambiar estos mecanismos rápidamente en respuesta a modificaciones del ambiente, temperatura y desinfectantes. *Salmonella* replica en ambientes húmedos, con menos de 85% de materia seca, aún con pocos nutrientes, y lo hace bien en abono, y en condiciones de humedad, temperatura y contaminación que se dan en las camas de las vacas confinadas. *Salmonella* a veces se encuentra en bajas dosis en alimentos comprados como fuentes de proteínas vegetales y fuentes de grasa animal y vegetal. Bajo condiciones ambientales de calor, al mezclar estas materias con alimento húmedo, como silo o henilaje, ocurre la replicación hasta alcanzar dosis infectivas. Aún luego de la desinfección y lavado es frecuente encontrar *Salmonella* por lo que su persistencia en el medio ambiente requiere más atención en los programas de control (Wray et. al., 1987). Es difícil el control de *Salmonella* por su habilidad para sobrevivir en el ambiente y por la presencia de animales portadores (Pelzer, 1989). El ganado que sufre la enfermedad clínica aguda puede eliminar 10^8 a 10^{10} *Salmonella* por gramo de materia fecal, durante un período de 2 a 12 semanas (Galland et al., 2000). La excreción de la bacteria por animales sin síntomas se puede deber a su estado de portador crónico, a encontrarse en la convalecencia luego de la enfermedad aguda o a estar recientemente colonizado. Los portadores pueden eliminar más de 10^8 *Salmonella* por gramo de heces, generalmente en forma intermitente. Esta propiedad debe ser tenida en cuenta en los estudios epidemiológicos ya que la prueba patrón es el cultivo a partir de materia fecal y la sensibilidad se ve disminuida por esta característica.

Incidencia en el hombre y los animales

En el Uruguay ha aumentando la incidencia de infecciones transmitidas por alimentos producidas por *Salmonella* no tifoidea (Instituto de Higiene, 2002). En 1995 se implementó el programa Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA), y desde entonces se ha constatado un aumento en el número de

brotos denunciados, donde predominan las causas bacterianas y *Salmonella* spp. es el agente más frecuentemente aislado, constituyendo el 75% de los aislamientos a partir de brotes de ETA de origen bacteriano entre los años 1995 a 2001. *Salmonella* fue el segundo agente de brote de ETA en América Latina y el Caribe entre los años 1995 y 1999 (SIRVETA, 2006), registrándose casi mil brotes entre 1993 y 2002, con un número de enfermos cercano a los 50.000 y 15 fallecidos. Un alto porcentaje de los casos no son notificados, y de aquéllos que sí lo son, muchos no se pueden asociar con el alimento de origen o no se puede identificar el agente responsable, debido a que es común que los resultados de los análisis bacteriológicos demoren y ya no se pueda encontrar la fuente de contaminación.

Recientemente, la incidencia de salmonelosis ha disminuido radicalmente en la Unión Europea, habiendo bajado el número de casos declarados a Enter-net de 100.267 en 1997, el año de máxima incidencia, a 73.006 en 2001 (Fisher, 1999). Desde la década de 1950 las infecciones por serotipos no tifoideos de *Salmonella* a partir de la ingestión de alimentos es la causa más frecuente de infección en Estados Unidos (Tauxe, 1997). La mayoría de los casos de salmonelosis en EUA tienen origen en los alimentos, fundamentalmente, aquellos de origen animal (Tauxe, 1991). En los Estados Unidos se producen estimativamente 1.3 millones de casos humanos de salmonelosis transmitidas por alimentos y 553 muertes por año (Mead et al., 1999), teniendo presente que se estima que se reporta sólo uno de 38 casos de enfermedad humana al sistema de vigilancia nacional. El hecho de que la enfermedad sea autolimitada y que los síntomas duren pocos días lleva a que muchas veces no se consulte al médico, y en consecuencia exista un subregistro de la enfermedad (Salyers & Whitt, 2001).

La prevalencia de *Salmonella* en producción animal es variable: 18 % en tambos (Weaver et al., 2000) en Inglaterra y Gales, 16 % en tambos en California (Pacer et al., 1989) y 0.46% en ganado lechero de descarte en el estado de Washington (Gay et al., 1994). Entre 1990 y 1994, fueron detectados 6.700 casos en vacunos, fundamentalmente por *S. Dublin* y *S. Typhimurium* (mayormente DT104), en ovinos 750 casos, en cerdos 1.400 incidentes, y en aves 10.000 (Wray & Davies, 1996). *S. Typhimurium* representó más del 25% de los incidentes, seguida por *S. Enteritidis* y *S. Dublin*.

Dos estudios conducidos por USDA:APHIS:NAHMS para caracterizar la prevalencia de salmonelosis y sus patrones de resistencia antibiótica en ganado de carne, reportan un 5,5 % de muestras positivas en casi 5.000, en 100 feedlots de trece estados, en un estudio; en el otro, realizado en 187 establecimientos de 22 estados se recuperó *Salmonella* del 1,4 % de las 5.000 muestras tomadas y procesadas (Dargatz et al., 2000a). Los resultados de ambos estudios indican que la ocurrencia de salmonelosis en poblaciones de ganado de carne es baja (menos del 6% de las muestras fueron positivas), y además la resistencia antibiótica es de baja incidencia (Dargatz et al., 2000b)

Medidas de control.

Como medidas de control en el establecimiento se enfatizan las medidas de manejo e higiene, además de tomar precauciones para animales portadores, manteniendo una correcta política de reemplazos, cuarentena, evitar áreas húmedas correcto almacenaje y manipulación de alimentos, control de vectores y calidad del agua. Hay una serie de obstáculos para el control, además de las características propias del microorganismo que son: la falta de buenos test de tamizaje, necesidad de pruebas con buena especificidad y sensibilidad para animales tanto para casos como para

portadores, inadecuada investigación que vincule factores de riesgo con la enfermedad, poca conciencia de que existe el problema, poco conocimiento del impacto económico y el abuso en la utilización de antibióticos para resolver y controlar problemas bacterianos (Bender, 1994). El autor propone tener en cuenta una serie de factores de riesgo potenciales, que clasifica en individuales y de rodeo; entre estos cita a los rodeos con gran número de animales, las prácticas inadecuadas de manipulación del estiércol, los rodeos “abiertos”, los alimentos contaminados por *Salmonella*, las enfermedades intercurrentes, la falta de prácticas de cuarentena, la inapropiada higiene en los utensilios utilizados en la alimentación de terneros y la presencia de vectores. Entre los factores individuales se pone énfasis en las enfermedades debilitantes, el stress asociado con el transporte, la falta de alimento, la escasa edad y los pobres niveles de inmunoglobulinas.

Una política de control de la salmonelosis involucra a varios eslabones de la cadena cárnica, del “campo al plato”. Además de las precauciones que se deben tener en la faena y en el manipuleo de los productos obtenidos, aún hasta en el hogar, el estudio de las características epidemiológicas en las primeras etapas del complejo cárnico es relevante para conocer la situación de partida. Teniendo esto último en vista es que se llevó a cabo el estudio que se describe en el apartado “Prevalencia de *Salmonella* spp. en la ganadería para carne del Uruguay”

Bibliografía

1. Acha P.N. & Scyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Volumen I. Bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. 3ª ed. Washington DC
2. Bender J., (1994). Reducing the risk of *Salmonella* spread and practical control measures in dairy herds. *The Bov. Pract.* 28 : 62-65
3. Buzby J.C., Roberts T., Jordan Lin C.-T., Mac Donald J.M. (1996). Bacteriological foodborne diseases: costs and productivity losses. Economic Research Service / USDA. Agricultural Economic Report N° 741.
4. Chambers PG, RJ Lysons (1979). The inhibitory effect of bovine rumen fluid on *Salmonella typhimurium*. *Res. Vet. Sci* 26:273-6.
5. Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J., Ladely S.R., Ferris K.E. (2000a). Survey of *Salmonella* serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. *J. Food Prot.* 63: 1648-1653
6. Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J., Ladley S.R. Wineland N.E., Ferris K.E. (2000b). Antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* isolates from beef cattle. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
7. Ekperigi H.E. & Nagaraja K.V. (1998). *Salmonella* Veterinary Clinics of North America: Food animal practice.14: 17-29.
8. Fisher IST. (1999) The Enter-net international surveillance network - how it works. *Eurosurveillance* 4:52-5.
9. Galland J.C., House J.K., Hyatt D.R., Hawkins L.L., Anderson N.V., Irwin C.K., Smith B.P. (2000). Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. *Vet. Microbiol.* 76: 143-151.

10. Gay J.M., Rice D.H., Steiger J.H. (1994). Prevalence of fecal *Salmonella* shedding by cull dairy cattle marketed in Washington State. *J. Food Prot.* 57 : 195-197
11. Instituto de Higiene (2002). *Salmonella* In: Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Facultad de Medicina. Universidad de la República
12. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Breese J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625
13. Murray M.J. (1986). *Salmonella*: virulence factors and enteric salmonellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189: 145-147
14. OIE (2004). Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5th Ed. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00129.htm
15. Pacer R.E., Spika M. D., Thurmond M.C., Hargrett-Bean N., Potter M.E.(1989). Prevalence of *Salmonella* and multiple antibiotic-resistant *Salmonella* in California dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195: 59-63
16. Murray M.J. (1986). *Salmonella*: virulence factors and enteric salmonellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189: 145-147
17. Pelzer, K. D., 1989. Salmonellosis *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195:456-463
18. Salyers A. A. & Whitt D.D. (2001). Bacterial pathogenesis. A molecular approach. 2nd. ed. ASM Press, Washington, D.C.
19. SIRVETA (2006). Sistema Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm
20. Tauxe R.V. (1991). *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J. Food Prot.* 54: 563-568.
21. Tauxe R.V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Inf. Dis.* 3: 425-434.
22. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.A., Persing, Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J.Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
23. Todd E. C. D., 1989a. Preliminary estimates of cost of foodborne diseases in the United States. *J. Food Prot.* 52 :595-601
24. Todd E. C. D., 1989b. Preliminary estimates of cost of foodborne diseases in Canada and cost to reduce salmonellosis . *J. Food Prot.* 52 : 586-594
25. Weaver J.P., Paiba G.A. Evans S.E. Davies R.H., Pascoe S.J.S., Kidd S.A. Dalziel R., Smith R.P. (2000). *Salmonella* prevalence on dairy farms in England and Wales. Proceedings of the XXI Congreso Mundial de Buiatría. Punta del Este, Uruguay
26. Wray C., Todd J.N & Hinton M. (1987). The epidemiology of *Salmonella* typhimurium infection in calves: excretion in faeces of calves in different management systems. *Vet. Rec.* 121: 293-296.
27. Wray C. & Davies R.H. (1996). A veterinary view of *Salmonella* in farm animals. *PHLS Microbiology Digest* 13 :44-48

PREVALENCIA DE *SALMONELLA* Spp EN LA GANADERIA PARA CARNE DEL URUGUAY.

I. INTRODUCCIÓN

El grupo *Salmonella* es uno de los agentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) más importantes en todo el mundo, y tiene en ocasiones a la carne bovina como vehículo de infección (Spika et al., 1987; Wall et al., 1995; White et al., 2001). Los productos cárnicos y lácteos, excluyendo los helados que contienen huevo, fueron la causa del 7% de los brotes de salmonelosis humana en Estados Unidos entre 1988 y 1992 (CDC, 1996). Se encontró que la prevalencia de infección por *Salmonella* en carcasas bovinas alcanzó un 1%, mientras que en carne picada la contaminación se evaluó entre un 5 a 7 % (CDC, 1995). Incluso alimentos secos de origen animal como leche en polvo, pueden jugar un rol importante en la epidemiología de la salmonelosis humana (Juven et al., 1984)). Aunque *Salmonella* no se multiplica cuando la actividad agua es baja, puede sobrevivir por largos períodos influyendo el contenido de oxígeno atmosférico, pH y temperatura. *Salmonella* está ampliamente distribuida en la naturaleza (Blood et al., 1992; Acha & Scyres, 2003). Aunque primariamente *Salmonella* se considera bacteria intestinal, está ampliamente distribuida en el ambiente y se encuentra comúnmente en diversos materiales contaminados con materias fecales (OIE, 2004). Se ha reconocido en todos los países y aparece como más prevalente en explotaciones intensivas, especialmente aves y cerdos. Los animales pueden enfermarse ocurriendo pérdida de producción y aún la muerte (Blood et al., 1992), aunque es frecuente aislar *Salmonella* de animales sanos (Fedorka-Cray et al., 1998; Dargatz et al., 2000a). Algunas cepas de *Salmonella* están adaptadas al huésped y puede ser eliminada sin que estén presentes síntomas de la infección, comportándose como un portador y contaminando el medio ambiente, pudiendo ocasionar infección y enfermedad en un huésped al que no está adaptada, entre los cuales se podría contar al hombre. Los portadores pueden eliminar más de 10^8 *Salmonella* por gramo de heces, generalmente en forma intermitente (Galland et al., 2000). Esta característica debe ser tomada en cuenta en los estudios epidemiológicos ya que la prueba patrón es el cultivo a partir de materia fecal y la sensibilidad se ve disminuida por esta razón. En el Uruguay ha aumentando la incidencia de infecciones transmitidas por alimentos producidas por *Salmonella* no tifoidea (Instituto de Higiene, 2002). En 1995 se implementó el programa Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA), y desde entonces se ha constatado un aumento en el número de brotes denunciados, donde predominan las causas bacterianas y *Salmonella* spp. es el agente más frecuentemente aislado, constituyendo el 57% de los aislamientos a partir de brotes de ETA de origen bacteriano entre los años 1995 a 2001 (Savio & Lindner, 2002). El origen de ese incremento se puede haber visto influenciado por la obligatoriedad de la denuncia, el subregistro previo o al aumento de la notoriedad de los brotes, aunque no se descarta que esa tendencia sea debida al aumento del aislamiento del serotipo Enteritidis desplazando a Typhimurium como principal responsable de los brotes. Estas bacterias son ubicuas, y producen intoxicaciones a punto de partida de diferentes orígenes, aunque la carne bovina no ha sido fuente de infección por esta causa desde que se registran las ETA, a partir de la década de 1970.

En los Estados Unidos se producen estimativamente 1.3 millones de casos humanos de salmonelosis transmitidas por alimentos y 553 muertes por año, teniendo presente que se estima que se reporta sólo uno de 38 casos de enfermedad humana al sistema de vigilancia nacional (Mead et al., 1999).

Las enfermedades humanas relacionadas significan un alto costo económico. En EUA el costo anual de ETA causadas por *Salmonella* se estima entre 600 y 3.500 millones de dólares (Buzby et al., 1996), debido al alto número de casos y al alto impacto que la enfermedad tiene en grupos de riesgo, lo que hace que sea uno de los problemas sanitarios más importantes asociados a los alimentos (Alterkruse et al., 1997). En Europa, según la OMS, se detectó un incremento de las ETA; entre 1993 y 1998 los brotes de causa bacteriana fueron el 86 %, siendo *Salmonella* la responsable por el 77% del total. La carne y los productos cárnicos fueron la fuente en el 15% de los brotes y se originaron en los hogares en un 42%. (FAO/WHO, 2002). Algunos de los patógenos más conocidos siguen suponiendo una amenaza constante para la salud pública aunque, a veces, se consideran erróneamente bajo control. Recientemente, la incidencia de salmonelosis ha disminuido radicalmente en la Unión Europea, habiendo bajado el número de casos declarados a Enter-net (Fisher, 1999).

La prevalencia de *Salmonella* en producción animal es variable, tanto en tambos (Pacer et al., 1989; Gay et al., 1994; Weaver et al., 2000) como en ganado para carne (Dargatz et al., 2000a, b), así como en otras especies animales, como cerdo, ovinos y aves (Wray & Davies, 1996).

Una serie de desafíos y amenazas que representa la salmonelosis entre otros patógenos responsables de ETA, impulsan a desarrollar actividades que combatan el problema. El primer desafío es la amplia distribución de alimentos, ya que los alimentos contaminados producidos en un país pueden causar la enfermedad fuera del mismo, lo que demuestra la importancia de contar con unos programas de control nacional sólidos (O'Brien & de Valk, 2003). El segundo desafío es la trazabilidad. La complejidad que presentan las cadenas de suministro de alimentos y/o la ausencia de marcadores de identificación de alimentos pueden dificultar enormemente la localización de su origen. Sin embargo, las advertencias sobre el peligro de ciertos alimentos y la retirada de productos dependen de la identificación exacta de los productos sospechosos. El tercer desafío es la resistencia antimicrobiana y el cuarto consiste en el desarrollo de la capacidad y las competencias necesarias, lo que ha motivado diversos programas de cooperación en la vigilancia epidemiológica de estas enfermedades en varias regiones, como Pulse-Net en EUA y Salm-gene en Europa, así como un programa de la WHO, iniciado en el año 2000, WHO Global Salm-Surv, que incluye una red de epidemiólogos y laboratoristas involucrados en la vigilancia de la salmonelosis. En Finlandia existe un programa de control desde 1995 (Seuna et al., 2000), que monitorea la prevalencia de *Salmonella* en distintas especies de animales y sus productos, manteniéndola por debajo del 1% gracias al programa de control. En definitiva se plantea el desafío que representa un enfoque sanitario totalmente integrado. El trabajo que se presenta se encuadra en un enfoque totalizador de la cadena alimentaria cárnica, dentro del concepto “desde la concepción hasta el consumo”.

Se podría sostener que con una faena higiénica y que controle los puntos de contaminación, no sería necesario conocer lo que sucede en el ámbito de los establecimientos. Sin embargo, hoy la filosofía imperante es la que asegura desde el nivel del establecimiento productor hasta el plato del consumidor la calidad del producto y su bajo riesgo. Inscrito en esa estrategia es que se realiza el estudio

epidemiológico que busca identificar, cuantificar y caracterizar la presencia de *Salmonella* spp. en predios productores de ganado para consumo.

El objetivo de este estudio es calcular la prevalencia de la *Salmonella* spp. en bovinos sanos, próximos a faena en el Uruguay, a nivel de establecimiento productor, como primer eslabón en la cadena cárnica.

II. MATERIALES Y METODOS

El estudio se basó en la recolección de materia fecal de bovinos en terminación, y seleccionados siguiendo un diseño de muestreo que permitiese determinar la presencia de los patógenos en este nivel de la cadena de producción de carne vacuna, dentro de márgenes de confianza que consideramos suficientes como para avalar, en una primera instancia la calidad del producto a nivel nacional. Se siguieron los lineamientos y protocolos utilizados en estudios similares realizados por el Sistema de Monitoreo Nacional de Salud Animal (NAHMS) en EUA, con algunas adaptaciones en el diseño. El estudio transversal se realizó durante todos los meses del año, procurando controlar la incidencia del factor estacional.

Diseño de Muestreo

Para la selección de la muestra, se tomó la base de datos de DICOSE 2001 como marco de muestreo. Se identificó como principal objetivo del muestreo los novillos de 3 años o más, por lo cual se decidió excluir aquellos establecimientos que tenían menos de 30 animales en esa categoría. El muestreo fue en dos etapas, en la primera etapa la unidad primaria de selección fueron los establecimientos que se estratificaron en 3 categorías: engorde a corral intensivo (feedlot), engorde tradicional (pasturas) y engorde de novillos en establecimientos lecheros (lechería). Dentro de cada estrato, se seleccionaron aleatoriamente por números generados en una computadora 30 establecimientos del giro lechero y 100 del giro ganadero y se incluyeron todos los establecimientos que engordan animales a corral (feedlot). Se sortearon 130 predios previendo que alguno no pudiese participar, tomado 120 de ellos para el estudio. De tal manera se estableció que serían estudiados 10 establecimientos por mes, durante un año, lo que resultaba viable según los recursos disponibles. Se tomó una muestra proporcionalmente mayor en establecimientos lecheros, estableciendo un sesgo, teniendo en cuenta que ese sistema de producción teóricamente podría presentar mayor frecuencia de aislamientos del patógeno, por su mayor tasa de contacto entre animales. Se requerían 8 predios ganaderos y 2 lecheros por mes, totalizando 96 y 24. Los feedlots fueron agregados en una segunda instancia. En la segunda etapa de selección la unidad secundaria de selección fueron los novillos de 3 años o más, los cuales se seleccionaron en forma sistemática. Se utilizó como límite inferior de peso de la categoría novillo en etapa de terminación 300 kg para las razas carniceras y 380 kg para las razas lecheras. Los predios de sistema intensivo incluyen a la totalidad de las trece firmas pertenecientes a productores afiliados a la Asociación Uruguaya de Productores de Carne Intensiva Natural (AUPCIN). En la tabla I se resumen los datos de la población ganadera del Uruguay según la declaración jurada de DICOSE, la cual fue tomada como referencia para definir el marco de muestreo.

Tabla I Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento. DICOSE 2001

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Vacas	Novillos por edad		
				≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	636.166	1.589	237.590	57.534	45.896	52.864
Canelones	231.873	4.227	76.847	17.439	23.485	22.327
Cerro Largo	849.699	2.990	317.199	66.069	63.736	68.825
Colonia	463.020	3.076	152.588	9.707	42.801	70.611
Durazno	697.272	2.090	249.748	64.555	59.772	58.274
Flores	362.994	926	121.206	22.860	31.382	40.138
Florida	745.892	2.896	283.732	45.209	55.647	56.885
Lavalleja	646.135	3.534	237.025	49.086	47.578	57.017
Maldonado	246.964	2.196	93.519	14.625	16.556	19.792
Montevideo	2.178	98	695	71	124	228
Paysandú	699.176	2.073	242.778	47.850	56.767	73.491
Río Negro	561.069	1.246	175.462	21.830	56.011	71.557
Rivera	608.049	2.303	237.536	39.726	33.596	45.993
Rocha	675.722	2.526	253.560	30.847	51.530	65.924
Salto	681.916	1.878	250.838	46.529	50.047	57.943
San José	384.244	2.905	150.517	8.203	25.060	37.894
Soriano	657.331	2.262	165.465	25.894	82.020	116.811
Tacuarembó	881.624	2.786	322.340	85.526	63.035	64.232
Treinta y Tres	567.466	2.023	239.230	26.753	34.130	40.543
T O T A L	10.598.790	43.624	3.807.875	680.313	839.173	1.021.349

El tamaño de la muestra propuesto es de 50 novillos en cada uno de los 120 establecimientos seleccionados. Este número de establecimientos permite detectar con un 95% de confianza al menos un establecimiento positivo si su frecuencia es igual o mayor al 2,5 %. El número de novillos muestreados dentro de los establecimientos permite detectar con un 95% de confianza aquellos que tengan una prevalencia de 6% o más del agente estudiado.

Al nivel de población de novillos, asumiendo que en promedio se muestrearán 40 por establecimiento y que el efecto de diseño no sea superior a 5 se estima que se podrá detectar una prevalencia mayor o igual 0,3% de novillos portadores el agente en estudio.

El análisis fue realizado con el paquete estadístico STATA/SE versión 8.2 (StataCorp, 2003) estimándose las prevalencias en función del diseño del muestreo. Para establecer la prevalencia de establecimientos positivos, se definieron como tales todo aquel que tuviera un aislamiento del agente considerado (*Salmonella* spp.). En el análisis de los establecimientos se ponderaron las estimaciones en función de la inversa de su probabilidad de ser seleccionados y se consideró la estratificación por giro de producción. Para las estimaciones a nivel de bovinos se ponderaron los datos a través de la inversa del producto de la probabilidad de seleccionar el

establecimiento por la probabilidad de seleccionar ese animal dentro del establecimiento y la categoría, se consideró la estratificación y que las unidades de muestreo secundario (novillos) forman conglomerados (clusters) dentro de los establecimientos. (Dargatz & Hill;1996, Skinner et al., 1989)

Recolección de muestras Las muestras se obtuvieron directamente del tracto intestinal, o del piso de los corrales en los feedlots y se refrigeraron hasta su envío al laboratorio. Los novillos seleccionados, fundamentalmente a la raza Hereford en predios con ganadería para carne aunque no se excluyeron otras razas. Las muestras tuvieron un peso mayor a los 30 gramos por animal, ya que se vio un aumento de la sensibilidad relativa con el tamaño de la muestra (Funk et al., 2000). Los establecimientos se muestrearon a razón de aproximadamente 10 por mes durante el período de un año, con el propósito de evitar la influencia de factores ambientales. Se observó una prevalencia mayor durante los meses de primavera y verano (6.8 y 11.4%) en comparación con otoño e invierno (4.0 y 2.8%) en un estudio llevado a cabo en EUA (Dargatz et al., 2003).

El período de recolección de muestras se extendió desde mayo de 2002 a julio de 2003, debido a que no pudo cumplirse estrictamente con el cronograma de actividades programado, lo que supuso la extensión del período de trabajo a catorce meses.

Laboratorio

Se trabajó en el Laboratorio del departamento de Protección de Alimentos de DILAVE-MGAP, que cuenta con el equipamiento necesario y el personal con experiencia bacteriológica en el cultivo de los agentes en estudio. El hecho de trabajar en un solo laboratorio tiene obvias ventajas ya que hace innecesario los controles entre varios laboratorios cuando las muestras se procesan en más de uno, y se evitan diferencias de interpretación de los resultados. Se procesaron las muestras trabajando con pooles de hasta 5 muestras. El uso de pooles de muestras permite aumentar el número de animales a estudiar, disminuyendo el número de muestras a procesar por el laboratorio, pudiendo abarcar más establecimientos y permitiendo un mejor uso de los recursos. Kivelä et al., en 1998 realizaron un estudio donde se comparó el muestreo en pooles con muestras individuales para detectar *Salmonella* en ganado, concluyendo que muestras de materia fecal en pooles de no más de 20 animales dan resultados seguros para pruebas de tamizaje en predios, con un nivel de concordancia alto entre ambos métodos ($\kappa = 0.98$). En consecuencia el uso de esta metodología no produce mayores alteraciones en los resultados. Si algún pool resultaba positivo, se procedió a procesar las muestras individuales que lo componían.

Aislamiento e Identificación de cepas de *Salmonella*.

Se siguió el procedimiento estándar utilizado en el laboratorio de bacteriología de CSU. Primero se realizó un pre-enriquecimiento en caldo tetrionato (TTB), y se incubó a 43° C por 18-24hs. Posteriormente se realizó el enriquecimiento para el cual se inoculó la muestra proveniente del medio TTB en un caldo Rapport-Vassiliadis (RV) y se incubó a 37° C por 18-24hs. Transcurrido el tiempo necesario para el óptimo crecimiento bacteriano, se sembró el RV con un hisopo estéril en xilosa lisina agar con tergitol 4 (XLT4) agar, el cual se incubó toda la noche a 37° C. Desde las tubos XLT4 con colonias presuntamente positivas (colonias rojas, con

centro negro) se seleccionaron 3 colonias y se sembraron en tubos de triple azúcar hierro agar (TSIA) y lisina hierro agar (LIA) respectivamente, ambos medios se incubaron a 37° C toda la noche. Se lee el TSI y la reacción de LIA: reacción positiva TSI para *Salmonella* spp. = K^a/A^b +; reacción positiva a LIA para *Salmonella* spp. = K^c/K^c + (a alcalino (rojo) b ácido (amarillo) c alcalino (púrpura) K: alcalino, A: ácido)

Los resultados se confirmaron con sueros polivalentes anti-*Salmonella* (BBL Poly O para serogrupo). La aglutinación indicó una reacción positiva. Así mismo, a partir del medio XLT4 se realizó una siembra (colonias rojas con centro negro) en un medio agar Mac Conkey, el cual se incubó a 37° C por 24hs. Posteriormente se tomó una colonia del mismo y se inoculó en un medio de agar nutritivo inclinado, el cual se incubó a 37° C por 18-24hs.

Se realizaron aproximadamente 20 controles de calidad para establecer los niveles de detección de las pruebas utilizadas, según los protocolos del CSU. Así, la noche anterior se preparaba el inóculo de *Salmonella* inoculando una colonia pura de un aislamiento conocido en medio de crecimiento no selectivo y se incubaba toda la noche. Al otro día se procedía a las diluciones y su posterior inoculación en cajas de Petri con agar no selectivo, incubándose toda la noche, para contar las colonias al otro día, calculando las unidades formadoras de colonia por ml. Ese segundo día se procedía a inocular una muestra conocida como negativa con cuatro de las diluciones obtenidas del inóculo conocido como positivo. Se identificaban de modo que el personal no pudiese distinguir las muestras, éstas se mezclaban y se incubaban para ser procesadas al otro día y se comparaban los resultados obtenidos a partir de las diluciones de la colonia pura y de las colonias obtenidas luego de la inoculación de la muestra negativa.

III. RESULTADOS

En la tabla II se resumen los mismos datos de la tabla I, pero después de proceder a la exclusión de los establecimientos con menos de 30 novillos de 3 años o más. Se observa que se excluyeron el 93% de los establecimientos, pero se mantuvo el 87% de la población objetivo: novillos de 3 años o mayores.

Tabla II. Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento, luego de la exclusión de los establecimientos con menos de 30 cabezas de novillos de 3 años o más. DICOSE 2001

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Novillos por edad		
			≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	236.009	249	53.809	29.283	22.266
Canelones	24.774	59	8.202	3.484	2.903
Cerro Largo	311.036	316	58.518	39.514	32.940
Colonia	29.752	57	6.616	5.025	5.893
Durazno	283.996	280	59.215	35.911	30.669
Flores	127.961	110	21.093	16.969	12.519
Florida	191.871	209	38.480	23.736	16.965
Lavalleja	176.815	242	39.782	20.089	17.524
Maldonado	36.643	73	9.558	4.961	3.649
Paysandú	191.457	205	43.419	25.135	20.733
Río Negro	138.508	110	19.478	22.011	17.089
Rivera	183.444	198	33.453	18.620	16.809
Rocha	174.768	152	26.223	23.623	22.595
Salto	222.222	201	42.058	28.589	21.377
San José	36.910	40	5.750	4.679	6.435
Soriano	114.796	120	23.118	26.134	19.439
Tacuarembó	366.737	365	78.674	43.202	34.518
Treinta y Tres	154.216	132	22.981	16.629	14.299
Total	3.001.915	3.118	590.427	387.594	318.622
% del total previo a la exclusión	28%	7%	87%	46%	31%

En la tabla III se observa la composición de los diferentes estratos en el marco de muestreo y los tamaños de muestra obtenidos los cuales fueron considerados en el análisis para la determinación de los pesos de ponderación.

Tabla III. Número de establecimientos según giro de producción, tamaños de muestras y probabilidad de selección.

Giro	Frecuencia	Muestra	Porcentaje
Ganaderos	3071	97	3%
Lecheros	34	23	68%
Feedlot	14	13	93%
T O T A L	3119	133	4%

En la figura 1 se observa la distribución de los establecimientos en el territorio del Uruguay según el sistema de información geográfico, mostrando la cobertura nacional. Por lo que en ella se observa, la cobertura lograda por este estudio es de carácter nacional como fuera buscado, y a su vez la representatividad de la población objetivo “novillos próximos a la faena” también fue alcanzada a través del método de muestreo utilizado. La cobertura de los feedlot fue prácticamente total, salvo un productor que se negó a participar. Por otro lado se logró una buena representación de los establecimientos típicos de producción de carne sobre pasturas y de aquellos dedicados a la producción de leche que tienen como actividad complementaria engordar novillos para faena.

Figura 1. Establecimientos ganaderos muestreados según el tipo de producción



En la tabla IV se resumen los resultados crudos obtenidos para *Salmonella* spp. En la tabla V se observan las estimaciones proyectadas a la población en función del diseño utilizado siendo $0,13\% \pm 0,07$ la prevalencia global en bovinos para carne. Los serotipos de *Salmonella* aislados fueron: Montevideo (3), Typhimurium (3), London (2), y Hartford (1), confirmados por el Centro Nacional de Referencia para *Salmonella*, en el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina.

Tabla IV Resultado del muestreo para *Salmonella* spp. pooles, establecimientos y novillos muestreados y procesados.

Giro	Pooles		Novillos		Establecimientos	
	n	+	n	+	n	+
Feedlot	119	0	670	0	13	0
Pasturas	869	7	4361	9	97	5
Lechería	193	0	962	0	23	0
T O T A L	1181	7	5993	9	133	5

No hay una correspondencia absoluta entre la cantidad de pooles, novillos y establecimientos, porque erróneamente se procesaron las muestras de los primeros predios en pooles de diez muestras cada una, en lugar de las cinco que hubiese correspondido.

Tabla V Estimaciones de prevalencia de bovinos positivos a *Salmonella* spp., total y por giro de actividad.

Mean	Subpop.	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	Deff
Survey mean estimation					
pweight:	peso			Number of obs =	5993
Strata:	giro			Number of strata =	3
PSU:	farm			Number of PSUs =	133
				Population size =	547913.23

salm	Feedlot	0	0	0 0	.
	Pasturas	.001292	.0006772	-.0000479 .0026318	2.101537
	Lecheria	0	0	0 0	.

	TOTAL	.0012747	.0006681	-.0000471 .0025965	2.101084

Las estimaciones a nivel de establecimientos las podemos observar en la tabla VI, siendo la proyección a la población de 5,08% ± 2,22. Observando por estratos se ve que sólo se detectó la presencia en animales en pasturas resultando negativos los novillos de establecimientos del giro lechero y de los feedlot.

Tabla VI Estimaciones de prevalencia de establecimiento positivos a *Salmonella* spp., total y por giro de actividad.

Survey mean estimation						
pweight: peso				Number of obs	=	133
Strata: giro				Number of strata	=	3
PSU: <observations>				Number of PSUs	=	133
				Population size	=	3118
Mean	Subpop.	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]		Deff
f_salm						
	Feedlot	0	0	0	0	.
	Pasturas	.0515464	.0225669	.0069005	.0961923	1.354274
	Lecheria	0	0	0	0	.
T O T A L		.0507694	.0222267	.0067965	.0947423	1.353165

IV. DISCUSION.

Se aisló *Salmonella* en 5 de los 133 establecimientos relevados, siendo en todos los casos pertenecientes al estrato de predios con animales para carne mantenidos sobre pasturas. Las muestras de establecimientos del giro lechero resultaron todas negativas, así como la de los productores de carne intensiva (feedlot). En consecuencia según la proyección a nivel de la población se espera poder aislar *Salmonella* en un 5% de los establecimientos con un error de $\pm 2\%$.

No se pueden realizar aseveraciones acerca de las diferencias encontradas entre los giros, debido a los tamaños de muestra en los estratos de establecimientos lecheros y feedlot, aunque podemos afirmar que estos tipos de explotación no constituyen mayor riesgo para ser fuente de contaminación por el patógeno como se podía presuponer en función de su manejo (mayor densidad de animales y uso de raciones). La prevalencia proyectada a partir de los 9 animales positivos en casi 6 mil investigados, arroja un resultado de $0.13\% \pm 0,07$, lo cual constituye comparativamente con otros estudios un valor muy bajo.

Así, podemos referirnos a otros trabajos como los dos estudios conducidos por USDA:APHIS:NAHMS para caracterizar la prevalencia de salmonelosis y sus patrones de resistencia antibiótica en ganado de carne, reportan un 5,5 % de muestras positivas en casi 5.000, en 100 feedlots de trece estados, en un estudio (Fedorka-Cray et al., 1998); en el otro, realizado en 187 establecimientos de 22 estados se recuperó *Salmonella* del 1,4 % de las 5.000 muestras tomadas y procesadas (Dargatz et al., 2000a). Los resultados de ambos estudios indican que la ocurrencia de salmonelosis en poblaciones de ganado de carne es baja (menos del 6% de las muestras fueron positivas), y además la resistencia antibiótica es de baja incidencia. (Dargatz et al., 2000b). Estudios posteriores confirmaron que las frecuencias de aislamientos son muy bajas ya que por ejemplo en el relevamiento entre octubre de 1999 y setiembre

de 2000 de EEUU se reportó 50,4% de los feedlot positivos y 6,3% de las muestras (Dargatz et al., 2003). En otro trabajo se encontró una prevalencia de 38% de los establecimientos y 5,5% de las muestras (Losinger et al., 1997). Las características de estos tipos de establecimientos en lo que refiere a instalaciones, manejo y capacidad, difieren marcadamente de los que se encuentran en nuestro país (USDA, 2000 a,b,c; Dargatz et al., 2000c). En Alberta, Canadá, se aisló *Salmonella* en 6 de 16 feedlots, con una frecuencia de 2.0 a 7.5 % en aquellos feedlots, alcanzándose valores de 20% a 60% en los corrales usados como hospitales, donde predominó la *S. Typhimurium* (Jim et al., 2000). En ganado para carne muestreado a nivel de planta de faena en Alberta, Canadá sólo se logró aislar *Salmonella* en un animal lo que arrojó una prevalencia de 0.08% (Van Donkersgoed et al., 1999), aunque el estudio adoleció de ciertas limitantes como el bajo número de muestras y el sesgo ya que no se seleccionaron los animales aleatoriamente.

La prevalencia encontrada en ganado lechero de descarte en el estado de Washington alcanzó el 0.46% (Gay et al., 1994); basados en antibiogramas y perfiles plasmídicos, tampoco los serotipos aislados coincidieron con los causantes de enfermedad humana en los dos años previos. La carne de este origen es la base de la materia prima para la industria de las hamburguesas (USDA, 1994) por lo cual estos datos son relevantes para estos países, no siendo importante esta fuente para el consumo en el Uruguay. Las características de los establecimientos lecheros en Uruguay difieren a las más frecuentes en Estados Unidos (USDA, 2002a, b), por lo cual las comparaciones no se pueden realizar linealmente. Sin embargo en aquel país la leche y los derivados lácteos no son fuente común de infecciones por *Salmonella* (Wells et al., 2001), debido a la pasteurización de los productos de este origen, aunque se han descrito brotes a partir de esa fuente en años anteriores debido al consumo de leche cruda, quesos y por contaminación cruzada (El-Gazzar & Marth, 1992) En el estudio de alcance nacional se recuperó *Salmonella* del 5.4 % de los bovinos lecheros y 18.1% de las vacas prontas para ir a faena en los próximos 7 días, en el 27.5% de los predios (Wells et al., 2001). Los cambios de dieta pueden explicar la diferencia de prevalencia entre las diferentes categorías. A partir del mismo estudio nacional de monitoreo de salud animal en 1996 se seleccionó una muestra de 100 tambos para estudiar factores de riesgo para eliminación de *Salmonella*, y se encontró una prevalencia estimada de 27.5% para rodeos (Kagambe et al., 2000). El USDA llevó a cabo otro estudio de monitoreo en 2002, poniéndose de manifiesto que no hubo grandes variaciones en la prevalencia de la salmonelosis, que alcanzó el 7.3% de las vacas y el 30.9% de los rodeos (USDA, 2005) La prevalencia de *Salmonella* en otros estudios arrojó valores de 18 % en tambos en Inglaterra y Gales (Weaber et al., 2000) a partir de muestras tomadas del ambiente, y 16 % en tambos en California (Pacer et al., 1989), teniendo en cuenta que en este caso los predios fueron seleccionados entre aquellos que estaban asociados epidemiológica y microbiológicamente a casos humanos de enfermedad. Incluso en este Estado se reportó que las vacas del 75% de los establecimientos lecheros grandes había tenido un contacto previo con *Salmonella* spp., según la evidencia serológica (Smith et al., 1994), pudiendo persistir la bacteria por prolongados períodos en ambiente de los tambos (Gay & Hunsaker, 1993). Hay que tener presente que el cultivo es el método patrón (gold standard) para los estudios epidemiológicos, aunque puedan subestimar la presencia del agente, ya que la respuesta serológica positiva sólo indica la exposición previa al antígeno. Es posible que un animal que presente respuesta serológica no albergue la bacteria en su organismo (Gray et al., 1996).

Considerando lo expuesto en el párrafo precedente, se debe recordar que el presente estudio estuvo dirigido a relevar la presencia de *Salmonella* spp. en ganado destinado al consumo, por lo cual se tuvieron en cuenta predios lecheros que tenían más de 30 novillos de más de 3 años, lo que llevó a que fuera relevado un bajo porcentaje de los tambos. En consecuencia el análisis de la infección en animales propiamente lecheros escapa a los objetivos propuestos.

En los estudios referidos anteriormente los serotipos más frecuentemente hallados en feedlots fueron *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Muenster* (Fedorka-Cray et al., 1998), no coincidiendo con los serotipos predominantes en casos humanos. En el mismo estudio nacional de 1996 en Estados Unidos, pero referido a tambos los serotipos más comúnmente aislados fueron *S. Montevideo*, *S. Menhaden* y *S. Kentucky* (Wells et al., 2001) y en 2002 lo fueron *S. Meleagridis*, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium* y *S. Kentucky* (USDA, 2005). En Inglaterra y Gales se aislaron de muestras del ambiente en tambos, principalmente *S. Dublin*, *S. Agama* y *S. Typhimurium* DT104 (Weaver et al., 2000). En líneas generales se hayan coincidencias con algunos de los serotipos encontrados en el presente trabajo: *S. Montevideo*, *S. Typhimurium*, no así con *S. London* y *S. Hartford*. A su vez estos serotipos difieren radicalmente con los encontrados en casos humanos, donde la *S. Enteritidis* es por mucho la más frecuentemente aislada entre 1996 y 2001 (Instituto de Higiene, 2002). *S. Typhimurium* es encontrada en brotes humanos y fue aislada en el presente estudio. Los sistemas de cría en USA arrojaron una prevalencia baja, aislándose *Salmonella* en el 1.4% de las más de 5000 muestras en el 11.2% de los establecimientos, siendo los serotipos más comunes *S. Oranienburg* y *S. Cerro*, diferentes a los hallados en nuestro trabajo (Dargatz et al., 2000a).

En sistemas modernos intensivos de producción animal se produce grandes cantidades de heces y su arrastre lleva a que alcancen el campo, pudiendo contaminar el ambiente y diseminar *Salmonella*, que puede sobrevivir por períodos de 11 a 12 semanas (Wray & Davies, 1996). También puede persistir en las instalaciones por largos períodos, incluso mayor a 18 meses (McLaren & Wray, 1991). Este tipo de explotación no es común en Uruguay, lo cual lleva a que el riesgo de infección en los animales sea menor.

Como fuente de infección para animales importan la presencia de roedores, pájaros, agua contaminada, pasturas, y fundamentalmente comida como huesos, carne, pescado, harinas (Pelzer, 1989). La contaminación de los alimentos ofrecidos a los bovinos con *Salmonella* y otras enterobacterias, también fue puesto de manifiesto en un estudio realizado tambos de Oregon, Estados Unidos (Kidd et al., 2002). El hecho de que los bovinos sean criados en condiciones más extensivas, a cielo abierto y con alimentación basada en pasturas, implica que esas fuentes de contaminación no sean relevantes y, en consecuencia, se esperaba y se obtuvo una menor frecuencia de la infección con *Salmonella*.

Como factores de riesgo en un estudio de casos- controles en Gran Bretaña se identificaron el ingreso de animales al predio, el confinamiento de los animales, la falta de instalaciones para separar bovinos enfermos de sanos, la presencia de aves no domésticas y gatos que pueden contaminar el alimento (Evans & Davies, 1996). En Uruguay como se expresó más arriba no es común el confinamiento de los animales ni alimentarlos con raciones que pudiesen ser contaminadas por otros animales, ni es común la enfermedad clínica (Bonilla et al., 1981). Otros riesgos potenciales son el manejo del estiércol, las prácticas poco higiénicas en el uso de utensilios en la alimentación de terneros y las enfermedades intercurrentes (Bender, 1994); ninguna de estas prácticas es común en la ganadería para carne en Uruguay, ni

es frecuente la aparición de brotes de enfermedades. En el estudio citado más arriba realizado en una selección de 100 tambos a partir de el estudio nacional NAHMS 1996, se puso de manifiesto que el tamaño el rodeo (mayor de 100 vacas), la región, el uso de sistemas de aspersion de agua para el lavado de los corrales y la alimentación con residuos de la industria cervecera originaron mayor probabilidad de encontrar animales eliminando *Salmonella* (Kagambe et al., 2000). La fracción de riesgo atribuible de población combinada para los cuatro factores alcanzó el 95%. A lo ya expuesto más arriba en lo que refiere a las diferencias existentes en las explotaciones en los diversos países hay que agregar que los subproductos de la industria cervecera no son de uso común en Uruguay. Factores de riesgo vinculados a la dieta también fueron descritos en otro ensayo en feedlots, evidenciando que la alimentación con sebo, con semilla de algodón entera o la cáscara en los siete días previos a la recolección de material estaba asociada a una mayor frecuencia de administración de alimentos (Losinger et al., 1997). Tampoco estos ingredientes forman parte de la dieta de los vacunos en Uruguay. El alimento del ganado es considerado incluso como un primer eslabón en la cadena de la granja a la mesa, más aún luego de la evidencia que vincula la alimentación con harina de carne y hueso a la presencia de la encefalopatía esponjiforme bovina, y a ésta con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el ser humano (Crump et al., 2002). Desde hace mucho tiempo hay evidencia de que el alimento para animales es frecuentemente contaminado con bacterias patógenas y que éstas logran entonces colonizar a esos huéspedes, y a su vez que los alimentos de origen animal son fuente de enfermedad humana.

Si bien es importante tener en cuenta que la eliminación de la bacteria no significa necesariamente la contaminación final del producto, que podría producirse en el frigorífico, manipuleo del producto, distribución a los puestos de venta y aún en los procesos de preparación de alimentos (Fedorka-Cray et al., 1998), hay evidencias de asociación entre serotipos excretados por animales y los causantes de brotes de enfermedad humana (Spika et al., 1987; Wall et al., 1995; White et al., 2001).

V. CONCLUSIONES

En general se puede concluir que los datos obtenidos luego de aplicar una metodología que cumple con requerimientos que brindan confiabilidad a los resultados obtenidos, muestran que la prevalencia de *Salmonella* es baja y su presencia no representa riesgo para la salud de los consumidores. Esta conclusión se hace más relevante si consideramos la prevalencia del patógeno en otros países y regímenes de producción. Supone, entonces, un valor agregado para las carnes bovinas producidas en las condiciones típicas del Uruguay, ya que la baja frecuencia de aislamientos en los animales como materia prima, es de vital importancia para obtener un producto saludable

En consecuencia, los datos obtenidos son un primer aporte en la búsqueda de posicionar el producto final de la cadena cárnica, en una categoría de bajo riesgo en lo referente a la inocuidad alimentaria en general, y a la presencia de *Salmonella*, en particular, motivo de preocupación en incremento en los consumidores, en todo el mundo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Acha P.N. & Scyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Volumen I. Bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. 3ª ed. Washington DC
2. Alterkruse S.F., Cohen M. L. , Swerdlow D. L., (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis* 3: 285-293.
3. Bender J. (1994). Reducing the risk of *Salmonella* spread and practical control measures in dairy herds. *The Bov. Pract.* 28 : 62-65
4. Blood D.C., Radostits O.M. (1992). *Medicina Veterinaria* Vol.1 .Ed. Interamericana. McGraw-Hill. 7ª. ed. Madrid.
5. Bonilla M, Agorio M. & Chiappe S (1981). Salmonelas aisladas a partir de animales o productos de origen animal. *Veterinaria* 78 : 145-148
6. Buzby J.C., Roberts T., Jordan Lin C.-T., Mac Donald J.M. (1996). Bacteriological foodborne diseases: costs and productivity losses. Economic Research Service / USDA. Agricultural Economic Report N° 741.
7. CDC (1995). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium serotype infection associated with eating raw ground beef. Vol. 44. *MMWR* , Wisconsin, 1994, pp 905-909.
8. CDC (1996). Surveillance for foodborne-disease outbreaks, Vol. 45. *MMWR*, USA, 1988-1992.
9. Crump J.A., Griffin P.M., Angulo F.J. (2002). Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin. Infec. Dis.* 35: 859-865.
10. Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J., Ladely S.R., Ferris K.E. (2000a). Survey of *Salmonella* serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. *J. Food Prot.* 63: 1648-1653
11. Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J., Ladley S.R. Wineland N.E., Ferris K.E. (2000b). Antimicrobial susceptibility patterns of Salmonellas isolates from beef cattle. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
12. Dargatz D.A., Loneragan G.H., Wagner B.A., Garber L.P., Hill G.W., Rodriguez J.M., Wineland N.E. (2000c) Health and management of cattle in United States feedlots. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
13. Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J., Ladely S.R., Koprál C.A., Ferris K.E., Headrick M.L. (2003). Prevalence and antimicrobial of *Salmonella spp.* isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *J Applied Micro* 95:753-761
14. Dargatz D.A., Hill G.W. (1996). Analysis of survey data. *Prev. Vet. Med.* 28: 225-237
15. El-Gazzar F.E. & Marth E.H. (1992). Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. *J Dairy Sci* 75:2327-2343.
16. Evans S. & Davies R. (1996). Case control study of multiple-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infection of cattle in Great Britain. *Vet Rec* 139:557-558
17. FAO/WHO. 2002. Foodborne diseases are on the rise in Europe. First pan-european conference on food quality and safety. Budapest, 25-28 de Febrero

18. Fedorka-Cray P.J., Dargatz D.A., Thomas L.A., Gray J.T. (1998). Survey of *Salmonella* serotypes in feedlot cattle. *J. Food Prot.* 61: 525-530.
19. Fisher IST. (1999) The Enter-net international surveillance network - how it works. *Eurosurveillance* 4:52-5.
20. Funk, J. A. Davies, P. R. Nichols, M.A.2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella* enterica in swine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 412-418
21. Galland J.C., House J.K., Hyatt D.R., Hawkins L.L., Anderson N.V., Irwin C.K., Smith B.P. (2000). Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. *Vet. Microbiol.* 76: 143-151.
22. Gay J.M. & Hunsaker M.E. (1993). Isolation of multiple *Salmonella* serovars from a dairy two years after a clinical salmonellosis outbreak. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 1314-1320
23. Gay J.M., Rice D.H., Steiger J.H., (1994). Prevalence of fecal *Salmonella* shedding by cull dairy cattle marketed in Washington State. *J. Food Prot.* 57 : 195-197
24. Gray J.T., Fedorka-Cray P.J., Stabel T.J., Kramer T.T. (1996). Transmission of *Salmonella* cholerasuis to naïve swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 141-146.
25. Instituto de Higiene (2002). *Salmonella* In: Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Facultad de Medicina. Universidad de la República.
26. Jim G.K., Schunicht O.C., Ayroud M., Booker C.W., Wildman B.K., Cassis R., Guichon P.T. (2000). Detection of *Salmonella* spp. in the feces of cattle in selected Alberta feedlots. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
27. Juven B.J., Cox N.A., Bailey J.S., Thomson J.E., Charles O.W., Shutze J.V. (1984). Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *J. Food Prot.* 47: 445-448.
28. Kabagambe E.K., Wells S.J., Garber L., Salman M.D., Wagner B., Fedorka-Cray P.J. 2000. Risk factors for fecal shedding of *Salmonella* in 91 US dairy herds in 1996. *Prev Vet Med* 43:177-194
29. Kidd R.S., Rossignol A.M., Gamroth M.J. (2002). *Salmonella* and other enterobacteriaceae in dairy-cow feed ingredients: antimicrobial resistance in Western Oregon. *J. Environ. Health* 64: 9-16
30. Kivelä, S.L Ruoho, O., Seun E., Hintikka E-L (1998). Pooles faecal samples compared with individual samples for detection of *Salmonella* in cattle. Proc. XX Congreso Mundial de Buiatría. 6-10 de julio, Sidney, Australia.
31. Losinger W.C., Garber L.P., Smith M.A. Hurd H.S., Biehl L.G., Fedorka-Cray P.J., Thomas L.A., Ferris K. (1997). Management and nutritional factors associated with the detection of *Salmonella* spp. from cattle fecal specimens from feedlot operations in the United States. *Prev Vet Med* 31:231-244.
32. McLaren I.M., Wray C. (1991). Epidemiology of *Salmonella* typhimurium infection in calves: persistence of *salmonella* on calf units. *Vet. Rec.* 129: 461-462
33. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Breese J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625
34. O'Brien S.J., de Valk H. (2003). *Salmonella* – “old” organism, continued challenges! *Euro Surveill* 8 (2):29-31
35. OIE (2004). Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals.5th Ed. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00129.htm

36. Pacer R.E., Spika M. D., Thurmond M.C., Hargrett-Bean N., Potter M.E.(1989). Prevalence of *Salmonella* and multiple antibiotic-resistant *Salmonella* in California dairies. J. Am. Vet. Med. Assoc.195: 59-63
37. Pelzer, K. D., 1989. Salmonellosis J. Am. Vet. Med. Assoc.195:456-463
38. Savio M. & Lindner C. 2002). Situación de las ETA en Uruguay. In: Jornada de trabajo para el fortalecimiento y rediseño del sistema VETA. MSP, OPS, OPS/HCP/FOS/URU.08.2002. 8 de Julio, Montevideo, Uruguay
39. Seuna E., Nuotio J., Maijala R.L. (2000). Ocurrence of *salmonella* infections in animals in Finland. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
40. Skinner C.J., Holt D., Smith T.M.F. (1989). Analysis of complex survey. Ed. John Wiley and Sons Ltd. New York.
41. Smith B.P., Roden L.D., Thurmond M.C., Dilling G.W., Konrad H., Pelton J.A., Picanso J.P. (1994). Prevalence of *salmonellae* in cattle and in the environment on California dairies. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205: 467-471.
42. Spika J.S., Waterman S.H, Soo Hoo G.W., St. Louis M.E., Pacer E.R., James S.M., Bissett M.L., Mayer L.W., Chiu J.Y., Hall B., Greene K., Potter M.E., Cohen M.L., Blake P.A.(1987). Chloranfenicol- resistance *Salmonella newport* traced through hamburguers to dairy farms. N. Engl. J. Med. 316: 565-570
43. StataCorp. 2003. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: StataCorp LP
44. USDA (1994).E. Coli O157:H7: issues and ramifications. USDA:APHIS:VS, CEAH. Fort Collins, CO. USA
45. USDA. (2000 a) Part I: Baseline reference of feedlot management practices, 1999. USDA:APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring system. Fort Collins, CO. USA
46. USDA (2000 b). Part III: Health management and biosecurity in U.S. feedlots, 1999. USDA:APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring system. Fort Collins, CO. USA
47. USDA (2000 c). Part II: Baseline reference of feedlot health and health management, 1999. USDA:APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring system. Fort Collins, CO. USA
48. USDA (2002a). Part I: References of dairy health and management in the United States, 2002.USDA:APHIS:VS, CEAH. Fort Collins, CO. USA
49. USDA (2002b). Part III: References of dairy cattle health and health management in the United States, 2002. USDA:APHIS:VS, CEAH. Fort Collins, CO. USA
50. USDA:APHIS:VS:CEAH. (2005). *Salmonella* on U.S. Dairy Operations: Prevalence and antimicrobial drug susceptibility
51. Van Donkersgoed, J. Graham, T. Gannon, V. 1999. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. Can.Vet.J. 40:332-338
52. Wall P.G., Morgan D., Lambden K., Griffin M., Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B. (1995).Transmission of multirresistance *Salmonella typhimurium* from cattle to man. Vet. Rec. 136: 591-592
53. Weaver J.P., Paiba G.A. Evans S.E. Davies R.H., Pascoe S.J.S., Kidd S.A. Dalziel R., Smith R.P. (2000). *Salmonella* prevalence on dairy farms in England and Wales. Proceedings of the XXI Congreso Mundial de Buiatría. Punta del Este, Uruguay

54. Wells S.J., Fedorka-Cray P.J., Dargatz D.A., Ferris K., Green A. (2001). Fecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farm and at cull cow markets. J. Food Prot. 64: 3-11.
55. White D.G., Zhao S., Sudler R., Ayers S., Friedman S., Chen S., McDermont P.F., McDermont S., Wagner D.D. Meng J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345: 1147-1154
56. Wray C. & Davies R.H. (1996). A veterinary view of *Salmonella* in farm animals. PHLS Microbiology Digest 13 :44-48

CAPÍTULO III: RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Internacionalmente se considera un problema emergente la aparición de resistencia antimicrobiana, estudiándose la posible diseminación desde los animales, de bacterias multiresistentes a través de los alimentos, llevando a establecer recomendaciones para monitorear y disminuir la difusión de estas cepas (Martel et al., 2001).

Los antibióticos se han venido usando desde hace más de 50 años, transformando la práctica de la Medicina Humana y Veterinaria. Es así que se pensó que se había llegado al éxito total en la lucha contra las infecciones. Pero ya desde los primeros años de su utilización se comenzó a percibir la resistencia a los mismos por parte de numerosos microorganismos (ejemplo: producción de penicilinas) (Solsby, 1999). La fármacoresistencia es un problema global que afecta a países en desarrollo y desarrollados, su difusión se ve facilitada por el enorme aumento de los viajes y el comercio mundial.

Muchos hongos del suelo y bacterias producen antibióticos para controlar a los microorganismos competidores, pero también portan genes de resistencia a los antibióticos, para que el mismo agente no sea destruido, por lo tanto, para cada antibiótico existe un mecanismo natural de resistencia. La resistencia se define según la OMS como la habilidad de un microorganismo de continuar su multiplicación o persistir su presencia ante niveles terapéuticos de un agente antibiótico (WHO, 2000).

La naturaleza de la resistencia y los procesos bioquímicos intervinientes se basan en la desactivación del medicamento antes de que éste alcance su objetivo dentro de la célula. Los mecanismos a nivel celular son variados: la superficie celular se puede hacer impermeable a la entrada de la droga, si ésta logra entrar o se expulsa la misma o se altera el objetivo del fármaco y las bacterias adquieren una vía metabólica alternativa. Los principales mecanismos de resistencia son la inactivación del antibiótico, la expulsión de la célula bacteriana (bomba de flujo) y la modificación del objetivo blanco (Walsh, 2003). La inactivación del antibiótico se logra por su destrucción o modificación enzimática. La bomba de flujo expulsa la droga del interior de la célula bacteriana logrando disminuir su concentración, efecto similar al conseguido por algunos gérmenes que impiden la unión del fármaco a la membrana celular dificultando su ingreso a la bacteria. La transformación del objetivo de los antibióticos puede llevar a que se evite que la droga le alcance, a veces duplicando el blanco que en su segunda versión es insensible a la droga, o en otro mecanismo, se sobreproduce ese objetivo para quitarle eficacia a la droga (Walsh, 2003).

Los mecanismos de resistencia adquirida son la vía vertical o horizontal: la primera por mutación (durante la división celular) y la segunda (la más importante) a través de la transducción (mecanismo mediado por bacteriófagos), conjugación (transferencia de genes por plasmidios y trasposones) y transformación (transferencia de DNA libre) (Levy a, 1998; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001) Estos mecanismos de transferencia de genes se producen a través de elementos genéticos móviles (plasmidios, transposones, integrones), compuestos de DNA de doble filamento con diferencias en su tamaño, estructura, propiedades biológicas y vías de difusión (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Luego de la introducción de un antimicrobiano en Medicina Humana o Veterinaria, el nivel de resistencia de las bacterias comensales y patógenas comienza a aumentar (Stobberingh y van den Bogaard, 2000). Hay modelos matemáticos que sugieren que el impacto del uso de antibióticos en los animales sucede tempranamente en la

emergencia de la resistencia, cuando las bacteria resistentes son raras (Smith et al., 2002). Así se pueden introducir nuevas cepas resistentes en la población humana y acelerar la aparición de la resistencia, para después verse afectado el equilibrio en la población según la tasa de uso de antibióticos en la Medicina Humana.

El motivo principal de preocupación en materia de resistencia antibiótica, es la amenaza que ésta representa para la salud humana, existiendo la posibilidad de ingresar en una era “*pos- antibiótica*” (Berkowitz, 1995; Tenover & Hughes, 1996). El uso y abuso de estas drogas ha aumentado drásticamente desde su introducción al mercado, hasta alcanzar cifras que rondan en los 25 millones de kilos anualmente en EUA, de las cuales la mitad fueron usadas incorrectamente (Levy, 1998 a). Esto obedece principalmente a prescripción médica excesiva, compra sin receta y automedicación, elección errónea del medicamento, dosificación o duración del tratamiento incorrectas, mala observación del tratamiento y empleo de medicamentos de baja calidad.

Hay cinco principios a destacar frente al problema de la resistencia. En primer lugar hay que tener presente, que dependiendo de la droga y el tiempo de uso, la resistencia inexorablemente va a aparecer. Como segundo punto hay que recordar que la resistencia es progresiva, hasta alcanzar niveles altos. El tercer principio es el que indica que aquellos organismos que son resistentes a una droga, más fácilmente lo van a ser a varias otras. En cuarto lugar, la resistencia puede ir desapareciendo, pero lentamente. Por último, hay que tener en cuenta que el uso de un antibiótico por un sujeto afecta a los demás de su entorno, así como al ambiente que le rodea (Levy, 1998 b).

En animales estabulados es necesario el uso de antibióticos incluso en dosis subterapéuticas, es así que el 40% del uso de antibióticos producidos en Estados Unidos se destinan a la comida animal. Son usados para el tratamiento de enfermedades bacterianas clínicas de animales individuales, para metafilaxis, como medicación subterapéutica en alimentos y como promotores de crecimiento en el alimento. La medicación en el alimento está más consistentemente asociada con la resistencia que el tratamiento inyectable individual, quizás debido a que se le administra a gran número de animales por largos períodos de tiempo, y a más bajas dosis, sumado a las propiedades farmacológicas de las drogas (McEwen et al., 2000). Con el uso de antibióticos en el ganado existe el riesgo de la transferencia de microorganismos zoonóticos resistentes a los antibióticos, la selección de resistencia en poblaciones bacterianas comensales no patógenas y la transferencia de esta resistencia a los comensales del intestino humano. Esta amenaza dio lugar en el Reino Unido al informe Swann hace ya más de 30 años, donde se establecieron las primeras recomendaciones para controlar el problema (Martel et al., 2001)) y fue el origen de otros comités e instituciones se crearan con el mismo fin. En algunos casos se sugiere su control estricto (Moller & Seyfarth ,2000) y aún países como Suecia han prohibido el uso de antibióticos como aditivos en los alimentos animales ya en 1986, haciéndose lo mismo con el uso de cuatro aditivos en la Unión Europea en 1998. Las autoridades danesas prohibieron el uso de ciertos agentes antibacterianos como promotores del crecimiento que son utilizados para el tratamiento de infecciones animales y humanas, y se establecieron programas de vigilancia y monitoreo del uso de antibióticos en animales (Moller & Seyfarth 2000). Los organismos multinacionales competentes también recomiendan medidas para el control de la resistencia (WHO, 1997; Solsby 1999). En Uruguay por decreto 177/004 de 2 de junio de 2004 se instrumenta un sistema de control de utilización de productos veterinarios en los ganados, a efectos de controlar su uso, evitando la

contaminación y/o alteración de los productos utilizados en los procesos industriales con el fin de preservar la salud humana y animal.

Esta preocupación dio lugar a una serie de estudios mayormente sobre investigación de brotes de enfermedades humanas que concluyen en la transferencia de bacterias antibiótico – resistentes del animal al hombre, siendo discutibles las evidencias alcanzadas (Riley et al., 1983; Hinton, 1986; Spika et al., 1987; Wall et al. 1995).

Recién hoy existe particular inquietud en el uso de los antibióticos en los animales como promotores del crecimiento cuando hay observaciones realizadas sobre el problema hace más de 50 años.

La resistencia antibiótica en los animales se ha detectado fundamentalmente en *Salmonella*, *E. coli*, estafilococos y *Campylobacter*. Además de estas confirmaciones en animales que producen alimentos, también se observa el problema en animales de compañía o exhibición y en peces cultivados. Las bacterias resistentes a los antibióticos se transfieren al hombre a través de contacto directo, por medio de la ruta fecal-oral o por incorrecto manipuleo o consumo de alimentos mal cocidos. La contaminación de la carne se da durante la faena y el procesamiento siendo que también las superficies del animal están contaminadas, así como su cavidad oral, además de las heces (Keen & Elder, 2000). Esta contaminación microbiana está influida por factores extrínsecos (ambiente, stress, temperatura) e intrínsecos (inherentes al producto) como pH, elementos nutritivos, potencial redox y actividad agua (Lazaneo, 1982). La principal contaminación de la carne proviene de fuentes externas, por la enorme carga microbiana asociada a cueros, pezuñas, pelos y contenido gastrointestinal. Muchos de los microorganismos que acceden a la carcasa durante el sacrificio provienen del personal, del equipo o del aire y agua usados. Esto ha llevado a estudiar medidas para disminuir la carga bacteriana tales como el uso del agua a 95° C, ácido láctico, vapor, y sus combinaciones (Bracked, 1994) así como implementar sistemas de trabajo como el análisis y control de puntos críticos “HACCP”, lo cual llevaría a disminuir el riesgo más que a su completa eliminación. La contribución del uso de antibióticos en los animales a la farmacoresistencia en el ser humano ha sido motivo de controversia por muchos años, aunque el riesgo potencial es cada vez más aceptado (WHO, 1997), siempre ha sido difícil obtener pruebas sólidas de este fenómeno (Radostits, 2000). Muchas conclusiones estarían basadas en supuestos mayormente en lo que se refiere al uso subterapéutico de antibiótico en el alimento para ganado. La probabilidad de que este uso resulte en la emergencia de patógenos entéricos zoonóticos antibiótico- resistentes, que se transfieran al hombre directa o indirectamente y causen enfermedad clínica difícil de tratar es desconocida; siendo sus estimaciones extremadamente pequeñas. Revisiones de la literatura (FDA, 2000) muestran limitaciones por varias razones: son muchas las bacterias potencialmente patógenas directamente al hombre, los estudios de desafíos no son representativos de la vida real, sólo hay suficientes estudios para aves y cerdos (fundamentalmente involucrando a *Salmonella*), la dieta o la línea genética pueden afectar la carga bacteriana, habiendo además variaciones entre países y sistemas de manejo. Sin embargo se mantiene la preocupación de que el uso no racional de antibióticos pueda contribuir a la prevalencia de la resistencia a los mismos.

La farmacoresistencia es un problema global que afecta a países en desarrollo y desarrollados, su difusión se ve facilitada por el enorme aumento de los viajes y el comercio mundial. El uso de antibióticos en la agricultura se manifiesta de manera tan evidente que para producir un kilo de carne destinada al consumo humano, se utiliza en Europa un promedio de 100 mg de antimicrobianos en la ganadería (Stöhr,

2000). Hay una serie de factores que contribuyen a ese uso excesivo de antibióticos: insuficiente educación sobre su uso prudente, son dispensados y administrados por personas con formación insuficiente, se usan dosis y combinaciones inapropiadas, se tratan empíricamente por falta de diagnóstico, prescripción innecesaria, venta libre, falta de calidad y aumento de la ganadería intensiva.

El impacto de la resistencia se puede comenzar a estudiar al comprobar que actualmente casi el 25% de la población mundial muere por causa de una enfermedad infecciosa, y que esa proporción se eleva al 45% en los países en desarrollo. Como problemas constatables dados por la resistencia se describen las infecciones hospitalarias, la necesidad de tener que utilizar combinaciones de hasta cuatro drogas para poder prevenir la emergencia de la resistencia durante la terapia, la “globalización” de la resistencia y su presencia en enfermedades de origen alimentario como es el caso de la Salmonelosis. Hay que agregar a los impactos negativos de la resistencia a la necesidad de usar nuevas drogas, productos más caros y a recurrir a la administración intravenosa de los pacientes, prolongándose además las hospitalizaciones, con el costo social sobreagregado que ello implica. Sin embargo es difícil cuantificar ese impacto en la morbilidad y mortalidad por infecciones, ya que existen factores de los cuales es difícil poder distinguirlos. La carga económica se calcula que es enorme, incluyendo los costos directos como el de tener que usar drogas más caras además de los costos propios de la enfermedad, incapacidad y mortalidad (Howarth & Scott, 2005).

Los ecosistemas microbianos humanos y animales están fuertemente interconectados lo que hace que la resistencia a los antibióticos cruce rápidamente los límites entre ellos. Los animales destinados al consumo son un reservorio de resistencia así como las personas tanto dentro como fuera de los hospitales, formándose una red que involucra entre estos una serie de rutas de transmisión a través de la materia fecal, escurrimiento de aguas, aguas de riego, plantas, comidas para animales y el hombre y productos cárnicos (Witte ,1998).

El impacto de la resistencia antimicrobiana se denota en el uso de nuevas drogas que son más caras, requieren el uso de la vía intravenosa y largas hospitalizaciones con el consecuente costo social. Se hace necesaria la creación de nuevos antimicrobianos siendo que actualmente son utilizadas variaciones de antibiótico ya existentes pertenecientes fundamentalmente a 6 familias (Skold, 2000).

La creación de nuevas drogas implica el gasto de grandes sumas de dinero para la industria farmacéutica, con la probabilidad que en pocos años deje de ser efectiva. Las estrategias utilizadas se basan en la modificación semisintética de fármacos ya conocidos, el diseño racional de nuevos compuestos y el tamizaje de fuentes naturales (Vázquez, 2001). Además interesan los nuevos enfoques de la terapéutica antibacteriana como la terapia fágica y las vacunas, y herramientas promisorias como bacteriófagos y péptidos antimicrobianos (catelicidinas, piscilinas) (Fisher ,2002). Adicionalmente hay que considerar métodos preventivos como alternativas y complementos al uso de antibióticos, disminuyendo la exposición microbiana (óptima higiene, aislamiento de animales enfermos, uso de semen y embriones, exclusión), aumentando la inmunidad y defensa del huésped (resistencia general por nutrición, ambiente e inmunidad específica) (Wierup ,2000).

Concluyendo, la emergencia de la resistencia antibiótica es contemporánea con el uso intensivo de antibióticos y es a principios del siglo XXI la principal amenaza para la efectividad de los programas de salud humana y animal; por lo tanto son importantes las recomendaciones sobre el uso prudente de los antimicrobianos. La presión de selección no es la única causa del aumento de la resistencias sino que éste

es un problema multifactorial, y requiere soluciones multifacéticas. Es también un asunto de seguridad alimentaria y no podemos sólo especular sobre la difusión de la resistencia de los animales al hombre sin datos, ni sobre la prevalencia de la resistencia en la flora normal de animales saludables.

La resistencia a las drogas antibacterianas fue demostrada en animales, en los alimentos, involucrando entre otros patógenos a *Salmonella* y a *E. coli* (Wall, 1995; White et al., 2001) determinando además un nuevo rol a cumplir por los profesionales que actúan en disciplinas vinculadas a estas temáticas (Dargatz, 1998) y promoviendo diversos proyectos para impedir el avance de este riesgo sanitario. Como ejemplo de esto se puede citar en EUA el Proyecto FAAIR: “Facts about Antibiotics in Animals and their impact on Resistance” desempeñado por APUA “Alliance for the Prudent Use of Antibiotics”, con la participación interinstitucional de organismos como “Food and Drug Administration” (FDA), “Center for Diseases Control and Prevention” (CDC) y “Environmental Protection Agency” (EPA). En vista de la importancia que el problema de la resistencia antimicrobiana representa en la actualidad, es que se plantea el estudio “*Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en la ganadería para carne del Uruguay*”, que procura determinar el perfil de susceptibilidad a estos fármacos en los ganados para carne, a nivel de establecimiento productor, en todo el país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berkowitz F. (1995) Antibiotic resistance to bacteria. Southern Medical Journal 88:797-804
2. Bracked R. (1994). Hot acid spray to decontaminate E. Coli O 157. J. Food Prot. 57:198-203
3. Dargatz D.A., Wells S.J, Fedorka-Cray P.J., Akkina J. (1998). The veterinary role in diagnosis, treatment, and prevention of multidrug resistant Salmonella Typhimurium DT104. Bovine Pract. 32:1-6
4. FDA (2000). Effect of the use of antimicrobials in food-producing animals on pathogens load: systematic review of the published literature. Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration
5. Fisher J. (2002).Renewing the fight against bacteria. The Scientist 16 (5):22
6. Hinton M. (1986). The ecology of *E. coli* in animals including man with particular reference to drug resistance. Vet. Rec. 119: 420-426
7. Howard D.H. & Scott R.D. II (2005). The economic burden of drug resistance. Clin. Infect. Dis. 41 (Suppl. 4): 283-286
8. Keen J.E. & Elder R.O. (2000) High prevalence of enterohemorrhagic E. Coli O157 on hide surface and in the oral cavity of finished beef feedlot cattle. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
9. Lazaneo H. (1982). Contaminación microbiana de la carne. III Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay
10. Levy S.B. (1998 a). The challenge of antibiotic resistance. Scientific American 278: 32-39
11. Levy S.B. (1998 b). The challenge of antibiotic resistance. Scientific American March 1998, 46-53

12. Martel J.L., Tardy F., Sanders P., Boisseau J. (2001). New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Vet. Res.* 32: 381-392.
13. Mc Ewen S.A., Poppe C., Popa M., Werber D., O'Connor A., Dunlop H. (2000). Therapeutic and in-feed antimicrobial use and resistance in fecal commensals of swine and cattle. Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 6-11 de Agosto, Breckeridge, Colorado, USA
14. Moller F. & Seyfarth A.M. (2000). Effect of intervention on the occurrence of antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93, 99-102
15. Radostits O.M. (2000). Does the use of antimicrobials in beef cattle health management and production promote the development of antimicrobial resistant pathogens and their transfer to humans causing disease which is difficult to treat? Proceedings of XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay
16. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Mc Gee, H.B. Wells, J.G. Davis, B.R. Hebert, R.J. Olcott, E.S. Johnson, L.M. Hargrett, N.T. Blake, P.A. Cohen, M.L.(1983). Hemorrhagic *colitis* associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England J. of Medicine.* 308:681-685.
17. Schwarz S. & Chaslus-Dancla E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32: 201-225.
18. Skold O. (2000). Evolution and mechanisms for spread of antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93, 23-27
19. Smith D.L., Harris A.D., Johnson J.A., Silbergeld E.K., Glenn Morris Jr. J. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 6434-6439.
20. Solsby L. (1999). Uso de antibióticos en producción animal y resistencia antibiótica. XI Reunión Interamericana de salud animal a nivel ministerial, Washington DC, USA, 13-15 de abril. OPS. RIMS A 11/10
21. Spika J.S., Waterman S.H, Soo Hoo G.W., St. Louis M.E., Pacer E.R., James S.M., Bissett M.L., Mayer L.W., Chiu J.Y., Hall B., Greene K., Potter M.E., Cohen M.L., Blake P.A.(1987). Chloranfenicol- resistance *Salmonella newport* traced through hamburguers to dairy farms. *N. Engl. J. Med.* 316: 565-570
22. Stobberingh E.E. & van den Boggard A.E. (2000). Spread of antibiotic resistance from food animals to man. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93:47-51.
23. Stöhr K.(2000). Problemas del uso de antimicrobianos en la agricultura y la ganadería. *Boletín de Medicamentos esenciales* N° 28: 10-11
24. Tenover F. & Hughes J. (1996). The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *Journal of the American Association* 275:300-304
25. Vázquez A. (2001). Desarrollo de nuevos antibióticos. Estrategias y expectativas. *Rev. de la Asoc. de Química y Farmacia del Uruguay* N° 30,11-13
26. Wall P.G., Morgan D., Lambden K., Griffin M., Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B. (1995).Transmission of multiresistance salmonella typhimurium from cattle to man. *Vet. Rec.* 136: 591-592
27. Walsh Ch. (2003). Antibiotics. Actions, origins, resistance. ASM Press, Washington, DC. 336 pp

28. White D.G., Zhao S., Sudler R., Ayers S., Friedman S., Chen S., McDermont P.F., McDermont S., Wagner D.D. Meng J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345: 1147-1154
29. WHO (2000). WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO Consultation with the participation of the FAO and the OIE, Geneve, 5-9 June 2000
30. WHO. (1997) Medical impact of antibiotic use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlin, germany, 13-17 October 1997 WHO/EMC/ZOO/97.4
31. Wierup M. (2000). Disease preventive methods as alternative and complements to use of antibiotics. Acta Vet. Scand. Suppl. 93, 135-142
32. Witte W. (1998) Medical consequence of antibiotic use in agriculture. Science 279: 996-997.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTI-MICROBIANOS EN LA GANADERÍA PARA CARNE DEL URUGUAY

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es considerada internacionalmente un problema emergente. La posible diseminación de bacterias multiresistentes de origen animal a través de los alimentos ha llevado a establecer recomendaciones para monitorear y disminuir la difusión de estas cepas. La emergencia de la resistencia es contemporánea con el uso intensivo de antibióticos, y es a principios del siglo XXI la mayor amenaza para la efectividad de los programas de salud animal y humana. Por lo tanto son importantes las recomendaciones sobre el uso prudente de los fármacos. La presión de selección no es la única causa de emergencia de la resistencia, sino que ésta se considera un problema multifactorial y requiere soluciones multifacéticas. Es también un asunto de inocuidad alimentaria y no se puede sólo especular sobre la difusión de la resistencia desde animales al hombre sin datos, ni sobre la difusión de la resistencia en la flora normal de animales saludables (Martel et al., 2001). Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) la resistencia a los antimicrobianos es la habilidad de un microorganismo de continuar su multiplicación o persistir su presencia en niveles terapéuticos de un agente antibiótico. (WHO, 2000).

La aparición de resistencia a las drogas en bacterias patógenas de origen alimentario es una consecuencia casi inevitable del uso de antimicrobianos en animales destinados al consumo humano (Threlfall et al., 2000). En 1997 la OMS concluye que el uso de antibióticos en cualquier ecosistema puede causar selección para la resistencia, ya sea su uso: terapéutico, profiláctico o como promotor de crecimiento (WHO, 1997). Además, se agrega que el uso prolongado y a bajas dosis ejerce presión para la resistencia aún mayor que el uso terapéutico. Los dos mayores factores que contribuyen a la resistencia antibiótica son el antibiótico en sí mismo y el tipo de resistencia que ha sido seleccionado para inhibir su acción, característica que puede traspasarse entre bacterias (Levy, 1998 a).

La resistencia de la flora fecal normal en animales de carne puede tener impacto en la resistencia de la flora normal de los consumidores humanos. Los antibióticos como aditivos en la dieta pueden ejercer presión selectiva en la flora normal de los animales, y en consecuencia a través de la carne y subproductos facilitar la aparición de resistencia en el hombre. Los microorganismos comensales resistentes sirven como reservorio de genes de resistencia que luego pueden ser transferidos a otros componentes de la flora o a agentes patógenos al establecerse el contacto entre los mismos (Sorum & Sunde, 2001; Gorbach, 2001).

El Instituto de Salud Animal de los Estados Unidos (Animal Health Institute, AHI) argumenta que el uso indiscriminado de antibióticos en Medicina Humana es el responsable más importante en la aparición de cepas resistentes, y minimiza la relación de éstas con el uso de drogas en los animales (Ferber, 2000). También se argumenta que faltan evidencias para relacionar la aparición de resistencia en el hombre con el uso de antimicrobianos en Medicina Veterinaria (Radostits, 2000) y se considera que el mayor obstáculo se encuentra en la dificultad de rastrear los pasos propuestos en la hipótesis planteada y alinearlos en una cadena epidemiológica. Esta preocupación dio lugar a una serie de estudios mayormente sobre investigación de brotes de enfermedades humanas que concluyen en la transferencia de bacterias antibiótico – resistentes del animal al hombre, siendo discutibles las evidencias

alcanzadas (Riley et al., 1983; Spika et al., 1987; Wall et al. 1995). La contribución del uso de antibióticos en los animales a la farmacoresistencia en el ser humano ha sido motivo de controversia por muchos años, aunque el riesgo potencial es cada vez más aceptado (WHO, 1997)), siempre ha sido difícil obtener pruebas sólidas de este fenómeno (Radostits, 2000).

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema global (Anderson, 1999). Los principales actores en salud pública temen que nos encontremos en la “era post-antibiótica”, donde la eficacia de los mismos está decayendo frente a los patógenos humanos (Berkowitz, 1995; Tenover & Hughes, 1996).

La creación de nuevas drogas implica el gasto de grandes sumas de dinero para la industria farmacéutica, con la probabilidad que en pocos años deje de ser efectiva. Por esta razón el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos está declinando en comparación con otros productos para tratar enfermedades crónicas o problemas del estilo de vida (APUA, 2005).

La resistencia de *Salmonella* a una gran cantidad de drogas se ha transformado en epidémica en el Reino Unido y ha aparecido en otras partes del mundo incluyendo los Estados Unidos.

La resistencia antibiótica en los animales se ha detectado fundamentalmente en *Salmonella*, *E. coli*, estafilococos y *Campylobacter* (Wall et al., 1995; White et al., 2001). Además de estas confirmaciones en animales que producen alimentos, también se observa el problema en animales de compañía o exhibición y en peces cultivados.

La posible diseminación de bacterias resistentes y multiresistentes desde los animales a los humanos a través de los alimentos, está determinando que varios países Europeos e instituciones internacionales establecieron recomendaciones generales para monitorear y contener la difusión de estas cepas (Martel et al., 2001; Schwarz & Chlaus-Dancla, 2001). El aumento significativo de cepas resistentes de patógenos zoonóticos, en varios países desarrollados ha impulsado, en el Reino Unido, la creación del Comité Swann el que estableció recomendaciones ante la aparición de resistencia en *S. Typhimurium* (Martel et al., 2001)

En Dinamarca desde 1995 se han tomado iniciativas para limitar el incremento de la aparición de resistencia, a través de un programa de vigilancia y monitoreo del uso de antibióticos y prohibición del uso de ciertos agentes antimicrobianos como promotores de crecimiento, recomendando que con este fin no se utilizasen las drogas que se emplean para tratar infecciones en el hombre y los animales (Aarestrup & Seyfarth, 2000). En algunos casos se sugiere su control estricto (Moller & Seyfarth, 2000) y aún países como Suecia han prohibido el uso de antibióticos como aditivos en los alimentos animales ya en 1986, haciéndose lo mismo con el uso de cuatro aditivos en la Unión Europea en 1998.

La resistencia se adquiere por mutación o cambios de determinantes genéticos (plasmidios, transposones) (Martel et al., 2001). Los principales mecanismos de resistencia son la inactivación del antibiótico, la expulsión de la célula bacteriana (bomba de flujo) y la modificación del objetivo blanco (Walsh, 2003).

Es difícil cuantificar el impacto en la morbilidad y mortalidad por infecciones, ya que existen factores de los cuales es difícil poder distinguirlos. La carga económica se calcula que es enorme, incluyendo los costos directos como el de tener que usar drogas más caras además de los costos propios de la enfermedad, incapacidad y mortalidad (Howarth & Scott, 2005).

Una vez que el gen de la resistencia se diseminó ampliamente, es difícil rastrear su origen (Witte et al., 2000), siendo la cadena alimenticia la principal ruta de

transmisión a los seres humanos. Los animales destinados al consumo son un reservorio de resistencia así como las personas tanto dentro como fuera de los hospitales, formándose una red que involucra entre estos una serie de rutas de transmisión a través de la materia fecal, escurrimiento de aguas, aguas de riego, plantas, comidas para animales y el hombre y productos cárnicos (Witte, 1998). La naturaleza ecológica del problema de la resistencia es subrayada por varios autores (Levy, 1998 b; ASM, 2000), indicando que las dificultades a que hoy nos vemos enfrentados derivan del esfuerzo realizado durante muchos años por tener un ambiente estéril, destruyendo indiscriminadamente toda bacteria.

Existen controversias sobre la cantidad de antimicrobianos que se administran a los animales destinados al consumo y los dedicados a ser administrados en Medicina Humana (Levy, 1998 a,b ; AHI, 2000; Gorbach, 2001; Mellon et al., 2001).

La susceptibilidad de las bacterias a las drogas antimicrobianas clásicamente se ha evaluado por medio de ensayos fenotípicos que calculan la habilidad de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano bajo una serie de condiciones especificadas de crecimiento, pudiéndose usar varias formas, incluyendo la difusión en disco, la dilución en agar y la dilución en caldos (Walsh, 2003).

Uruguay tiene una ganadería de carne que se caracteriza por un manejo extensivo, con una baja carga de animales por superficie, con sistemas donde prácticamente no se utilizan concentrados alimenticios y donde el uso de antibióticos es muy esporádico. Estos factores hacen presumir que los agentes microbianos presentan una alta susceptibilidad a los agentes antibacterianos, pero se carecen de evidencias que avalen esta hipótesis.

Este estudio tiene como objetivo detectar la posible presencia de resistencia a los antimicrobianos en agentes comensales de la flora intestinal en nuestra ganadería de carne y cuantificar su difusión.

II.MATERIALES Y MÉTODOS

Se buscó seguir los lineamientos y protocolos utilizados por el Sistema Nacional de Monitoreo de la Salud Animal (NAHMS), del Departamento de Agricultura de EUA (USDA), con algunas adaptaciones a nuestro medio. Para estos se contó, en la etapa preparatoria y durante el desarrollo del proyecto, con el entrenamiento y asesoramiento del Laboratorio Veterinario de la Universidad Estatal de Colorado (CSU) y de técnicos del CEAH-APHIS.

En este caso se realizó el estudio sobre la categoría novillos en la etapa de terminación, tanto en establecimientos de ciclo completo como en aquellos dedicados al engorde. Se trabajó sobre *E. coli* genérica como indicador del problema, ya que esta bacteria es usada frecuentemente como representativa de las enterobacterias de la flora intestinal, obteniéndose a menudo de las heces (Sorum & Sunde, 2001).

La principal modificación de los protocolos seguidos por el NAHMS fue el incremento del tamaño de la muestra de 30 a 50 novillos por establecimiento y la utilización de muestras compuestas “pooles” de 5 animales dentro de cada establecimiento.

El laboratorio de análisis fue el departamento de Protección de Alimentos de la Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DILAVE-MGAP).

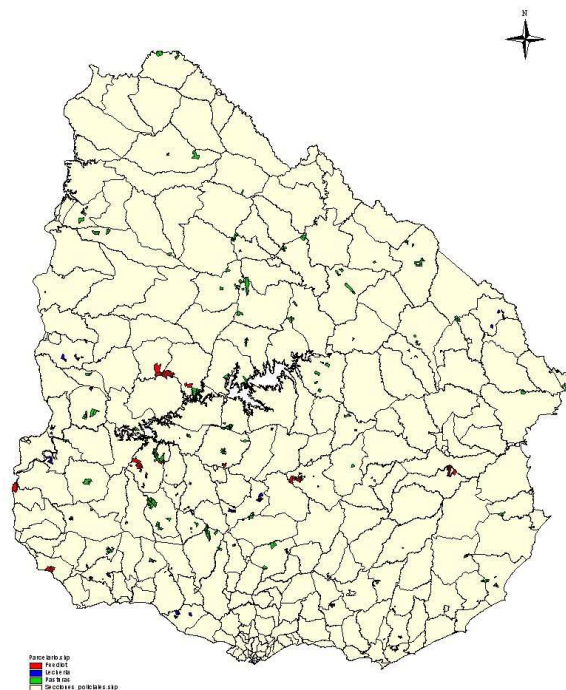
Para la selección de la muestra, se tomó la base de datos de DICOSE 2001 como marco de muestreo. Se identificó como principal objetivo del muestreo los novillos

de 3 años o más, excluyéndose los establecimientos que tenían menos de 30 animales en esa categoría.

El muestreo fue en dos etapas, en la primera etapa la unidad primaria de selección fueron los establecimientos que estaban estratificados en 3 categorías: engorde a corral intensivo (feedlot), engorde tradicional (pasturas) y engorde de novillos en establecimientos lecheros (lechería). Dentro de cada estrato, se seleccionaron aleatoriamente por números generados en una computadora 30 establecimientos del giro lechero y 100 del giro ganadero y se incluyeron todos los establecimientos que engordan animales a corral (feedlot). Se sortearon 130 predios previendo que alguno no pudiese participar, tomado 120 de ellos para el estudio. De tal manera se estableció que serían estudiados 10 establecimientos por mes, durante un año, lo que resultaba viable según los recursos disponibles. Se tomó una muestra proporcionalmente mayor en establecimientos lecheros, estableciendo un sesgo, teniendo en cuenta que ese sistema de producción teóricamente podría presentar mayor frecuencia de problemas de resistencia antimicrobiana, por el uso más común de antimicrobianos. Se requerían 8 predios ganaderos y 2 lecheros por mes, totalizando 96 y 24. Los feedlots fueron agregados en una segunda instancia. En la segunda etapa de selección la unidad secundaria de selección fueron los novillos de 3 años o más, los cuales se seleccionaron en forma sistemática entre aquellos en etapa de terminación con un peso mínimo de 300 kg para las razas carniceras y 380 kg para las razas lecheras. En la figura 1 se observa la distribución de los establecimientos en el territorio del Uruguay según el sistema de información geográfico.

Las muestras fecales fueron tomadas directamente del tracto intestinal con guantes individuales en todos los casos, salvo en los establecimientos que engordan a corral donde se tomaron del piso. Una vez tomadas las muestras se refrigeraron en forma inmediata, hasta su envío al laboratorio

Figura 1. Establecimientos ganaderos muestreados según el tipo de producción.



A los efectos de controlar los efectos estacionales, la muestra se distribuyó en un año calendario cubriendo todo el territorio nacional.

El análisis fue realizado con el paquete estadístico STATA/SE versión 8.2 (Stata Corp., 2003)

Aislamiento e identificación de cepas genéricas de *Escherichia coli*.

Se siguió el procedimiento estándar utilizado en el laboratorio de bacteriología de CSU. A partir de cada pool se inoculó, por medio de un hisopo estéril, una placa de Mac Conkey con 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronide (MUG; REMEL; Lenexa, KS) y se incubó toda la noche a 37° C. A continuación a partir de las colonias sospechosas se procedió a realizar el aislamiento e identificación, para lo cual se inoculó una placa de agar sangre a partir de las colonias sospechosas del agar Mac Conkey y se incubó toda la noche a 37° C. Por último, para confirmar el aislamiento se realizó la prueba de indol. Para ello se tomó una colonia de la placa de agar sangre, se la colocó en un portaobjetos y se la conjugó con el reactivo de indol. Un desarrollo de color azul antes de un minuto se considera una reacción positiva al indol, y confirma la existencia de *E.coli* en el medio de cultivo.

Pruebas de Resistencia a los anti-microbianos.

Las cepas aisladas de *E. coli* genérico fueron probadas por la resistencia a los antimicrobianos según la prueba de susceptibilidad a la difusión de los discos, también conocida como método de Kirby-Bauer, con el procedimiento estándar de la CSU e interpretado de acuerdo al Comité Nacional para los Standards de los Laboratorios Clínicos (NCCLS, 1999). Así se inocula la suspensión con los microorganismos a estudiar, luego de mezclar por medio del vortex, en toda la superficie de la placa; luego de la inoculación confluyente por la superficie de la placa Mueller-Hinton, se dejan caer los discos de antibióticos con el dispensador, se da vuelta la placa y se incuba a 34-36°C por 18-24 horas. Luego se mide el halo de inhibición del crecimiento, se registra e interpreta.

La selección de los antimicrobianos a probar se hizo en función de aquellos más utilizados en el mercado de Uruguay, de su facilidad de desarrollar resistencia y de la opinión de expertos en el tema. Prácticamente fueron considerados representantes de todos los grupos sugeridos para considerar en las pruebas de rutina en aislamientos de bovinos por el NCCLS (NCCLS, 1999).

Los antimicrobianos representados pertenecen a los grupos de los β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), tetraciclinas, aminoglicósidos, quinolonas, sulfonamidas y combinaciones.

Por el grupo de penicilinas se probaron: ampicilina (AM) y amoxicilina (AMC). Por las cefalosporinas se probó ceftiofur (XNL). De los aminoglicósidos fueron probados: estreptomina (S) y gentamicina (GM). Por las sulfonamidas y combinaciones fueron probados: sulfasozasole (G) y trimetoprim/sulfametoxasole (SXT). Dentro del grupo de las quinolonas se estudió el ácido nalidixico (NA) y finalmente por los 2 restantes grupos fueron: tetraciclina (TE) y cloranfenicol (C). Una vez realizada la prueba de los discos de difusión e incubada la placa se procedió a medir en milímetros, para cada antimicrobiano, el diámetro del halo de inhibición de crecimiento del agente. Los resultados para cada antimicrobiano fueron interpretados de acuerdo a la tabla I con los criterios tomados del NCCLS. Las categorías para la interpretación de los resultados fueron:

- **Susceptible:** significa que el agente de la cepa bacteriana aislada, puede ser inhibido por la dosis recomendada del antimicrobiano.
- **Intermedio:** esta categoría está dada por una zona que previene de discrepancias en las interpretaciones, en otras palabras que organismos resistentes sean catalogados como susceptibles o la situación inversa.
- **Resistente:** las cepas resistentes no son inhibidas por la dosis y secuencia recomendada.

Tabla I. Puntos de corte para la clasificación de *E. coli* frente a los antimicrobianos estudiados (en mm).

Agente Antimicrobiano		Susceptible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	AM	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Amoxilina	AMC	≥ 20	15 - 19	≤ 14
Ceftiofur	XNL	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Estreptomocina	S	≥ 15	12 - 14	≤ 11
Gentamicina	GM	≥ 15	11 - 14	≤ 10
Sulfasozasole	G	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Trimetoprin/Sulf	SXT	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Ac. Nalidixico	NA	≥ 19	14 - 18	≤ 13
Tetraciclina	TE	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Cloranfenicol	C	≥ 18	13 - 17	≤ 12

Controles de Calidad y Niveles de Detección.

La calidad de las pruebas de susceptibilidad fueron estandarizadas con patógenos estándares *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *E. coli* ATCC® 25922 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853. Los límites de control se registran en la tabla II con datos tomados del NCCLS. Estas pruebas fueron corridas periódicamente y cada vez que se realizó un cambio de medio. Se corrieron un total de 58 ensayos para cada uno de los antimicrobianos probados.

Tabla II. Límites de control para el monitoreo de las pruebas de susceptibilidad con patógenos veterinarios, zonas medidas en mm. Pruebas individuales en medio Mueller-Hinton con sangre u otros suplementos.

Agente Antimicrobiano		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		ATCC®25922	ATCC®25923	ATCC®27853
Ampicilina	AM	16 – 22	27 – 35	-----
Amoxicilina	AMC	19 – 25	28 – 36	-----
Ceftiofur	XNL	26 – 31	27 – 31	14 – 18
Gentamicina	GM	19 – 26	19 – 27	16 – 21
Sulfasozasole	G	15 – 23	24 – 34	-----
Trimetoprin/Sulf	SXT	24 – 32	24 – 32	-----
Tetraciclina	TE	18 – 25	24 – 30	-----
Cloranfenicol	C	21 – 27	19 – 26	-----

Estudio de asociaciones de hallazgos, según tipo de explotación

A los efectos de establecer si existía algún nivel de asociación entre el tipo de producción y la presencia de resistencia a los antimicrobianos, se sometieron a prueba de hipótesis. La hipótesis nula fue de que las variables tipo de producción y categorización por resistencia a cada uno de los antimicrobianos eran independientes. La prueba utilizada fue la de chi cuadrado (χ^2) y cuando el número de algunas de las celdas era 0 o tendía al mismo se recurrió a la prueba exacta de Fisher. Dado que los datos originalmente se mostraban en una escala cuantitativa también se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual se reporta como una información auxiliar, pero no se la consideró para la interpretación de los datos.

III. RESULTADOS

Conociendo que la utilización de agentes antimicrobianos es prácticamente inexistente en la ganadería de carne del Uruguay, se sesgó la muestra y se consideraron aquellas poblaciones que a priori podrían tener mayor riesgo, como pueden ser las poblaciones de novillos de razas lecheras (fundamentalmente Holando) y todas las explotaciones con animales en engorde a corral (feedlot) que existen en el país

En la tabla III se resumen los datos de la población ganadera del Uruguay según la declaración jurada de DICOSE, la cual fue tomada como referencia para definir el marco de muestreo. En la tabla IV se resumen los mismos datos de la tabla III, pero después de proceder a la exclusión de los establecimientos con menos de 30 novillos de 3 años o más.

Tabla III. Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento. DICOSE 2001.

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Vacas	Novillos por edad		
				≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	636.166	1.589	237.590	57.534	45.896	52.864
Canelones	231.873	4.227	76.847	17.439	23.485	22.327
Cerro Largo	849.699	2.990	317.199	66.069	63.736	68.825
Colonia	463.020	3.076	152.588	9.707	42.801	70.611
Durazno	697.272	2.090	249.748	64.555	59.772	58.274
Flores	362.994	926	121.206	22.860	31.382	40.138
Florida	745.892	2.896	283.732	45.209	55.647	56.885
Lavalleja	646.135	3.534	237.025	49.086	47.578	57.017
Maldonado	246.964	2.196	93.519	14.625	16.556	19.792
Montevideo	2.178	98	695	71	124	228
Paysandú	699.176	2.073	242.778	47.850	56.767	73.491
Río Negro	561.069	1.246	175.462	21.830	56.011	71.557
Rivera	608.049	2.303	237.536	39.726	33.596	45.993
Rocha	675.722	2.526	253.560	30.847	51.530	65.924
Salto	681.916	1.878	250.838	46.529	50.047	57.943
San José	384.244	2.905	150.517	8.203	25.060	37.894
Soriano	657.331	2.262	165.465	25.894	82.020	116.811
Tacuarembó	881.624	2.786	322.340	85.526	63.035	64.232
Treinta y Tres	567.466	2.023	239.230	26.753	34.130	40.543
T O T A L	10.598.790	43.624	3.807.875	680.313	839.173	1.021.349

Se observará que se excluyeron el 93% de los establecimientos, pero se mantuvo el 87% de la población objetivo: novillos de 3 años o más.

Tabla IV. Distribución de bovinos y establecimientos por categorías según departamento, luego de la exclusión de los establecimientos con menos de 30 cabezas de novillos de 3 años o más. DICOSE 2001

Departamento	Bovinos	Establecimientos	Novillos por edad		
			≥3años	2-3 años	1-2 años
Artigas	236.009	249	53.809	29.283	22.266
Canelones	24.774	59	8.202	3.484	2.903
Cerro Largo	311.036	316	58.518	39.514	32.940
Colonia	29.752	57	6.616	5.025	5.893
Durazno	283.996	280	59.215	35.911	30.669
Flores	127.961	110	21.093	16.969	12.519
Florida	191.871	209	38.480	23.736	16.965
Lavalleja	176.815	242	39.782	20.089	17.524
Maldonado	36.643	73	9.558	4.961	3.649
Paysandú	191.457	205	43.419	25.135	20.733
Río Negro	138.508	110	19.478	22.011	17.089
Rivera	183.444	198	33.453	18.620	16.809
Rocha	174.768	152	26.223	23.623	22.595
Salto	222.222	201	42.058	28.589	21.377
San José	36.910	40	5.750	4.679	6.435
Soriano	114.796	120	23.118	26.134	19.439
Tacuarembó	366.737	365	78.674	43.202	34.518
Treinta y Tres	154.216	132	22.981	16.629	14.299
Total	3.001.915	3.118	590.427	387.594	318.622
% del total previo a la exclusión	28%	7%	87%	46%	31%

En la tabla V se observa la composición de los diferentes estratos en el marco de muestreo y los tamaños de muestra obtenidos los cuales fueron considerados en el análisis para la determinación de los pesos de ponderación.

Tabla V. Número de establecimientos según giro de producción, establecimientos muestreados y porcentaje de muestreo

Giro	Frecuencia	Muestra	Porcentaje
Ganaderos	3071	97	3%
Lecheros	34	23	68%
Feedlot	14	13	93%
TOTAL	3119	133	4%

Los resultados de los controles de calidad para las pruebas de detección de resistencia, en el caso de *E. coli* son presentados en la tabla VI donde, se observa que

todos los valores medios se encuentran dentro de los rangos planteados en la tabla II. No obstante la corrección de los valores medios, se observa que en algunos controles hay valores mínimos o máximos que escapan a los rangos. De los datos recabados se puede concluir que la ampicilina, amoxilina y streptomina en todos los casos estuvieron dentro de los rangos; gentamicina sólo estuvo fuera del rango en una prueba y ceftiofur, sulfasozasola, tetraciclina y cloranfenicol salieron del rango en 2 o más oportunidades.

Tabla VI Resumen de resultados de los controles de calidad con la cepa estándar de *E. coli* ATCC® 25922 frente a los diferentes antimicrobianos probados.

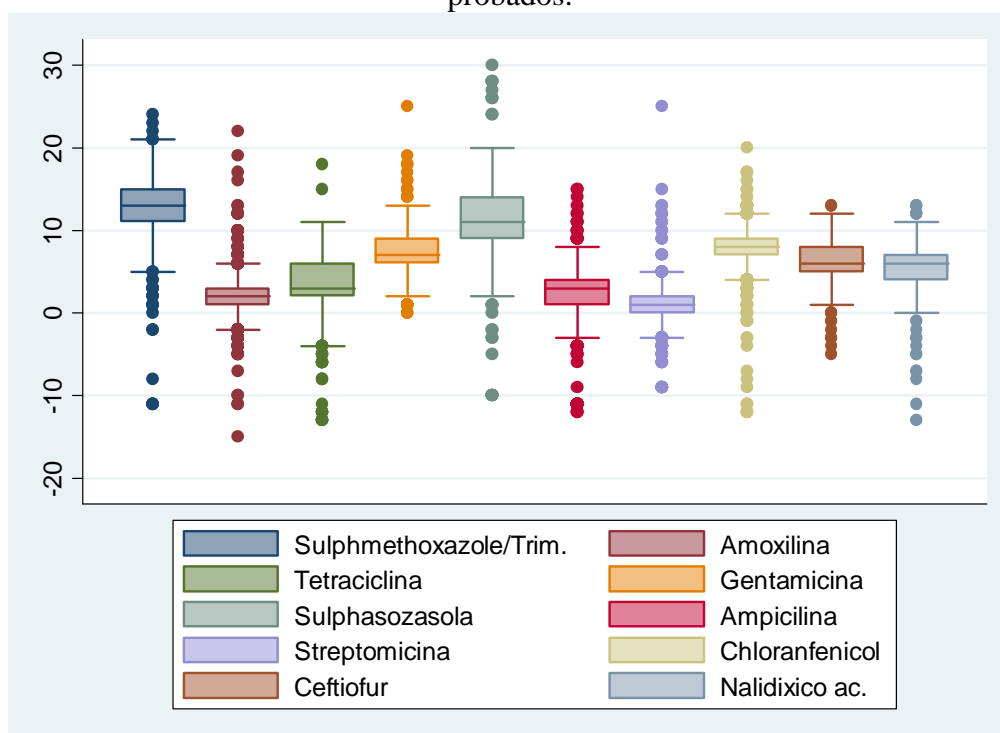
Antimicrobiano		Obs	Media	Desv.St.	Min	Max
Ampicilina	AM	21	19.524	1.537	17	22
Amoxilina	AMC	21	21.524	1.436	19	24
Ceftiofur	XNL	14	27.929	1.859	25	32
Gentamicina	GM	21	22.762	2.234	20	28
Sulfasozasola	G	21	21.381	1.717	18	25
Trimetoprin/Sulph	SXT	21	27.381	1.596	25	30
Tetraciclina	TE	21	23.810	3.027	19	28

Sobre los aislamientos de *E. coli* genérica obtenidos de las heces de los novillos muestreados, se realizaron las pruebas con los antimicrobianos resumiéndose los resultados en la tabla VII. Los valores medios de los aproximadamente mil quinientos ensayos, cayeron dentro del área de susceptibilidad a los antimicrobianos probados. En la figura 2 se observa la distribución de los valores de cada aislamiento tomando como punto de referencia “0” el punto de corte para la clasificación de resistente al antimicrobiano probado.

Tabla VII Resultados de las pruebas antimicrobianas realizadas en los aislamientos de *E. coli* genérica.

Antimicrobiano		Obs	Media	Desv. St..	Min	Max
Ampicilina	am	1547	19.401	2.8455	5	32
Amoxilina	amc	1506	22.080	2.5273	5	42
Ceftiofur	xnl	1278	27.352	2.1130	16	34
Streptomina	s	1549	15.756	2.2804	6	40
Gentamicina	gm	1545	22.429	2.1996	15	40
Sulfasozasola	g	1547	27.269	4.0348	6	46
Trimetoprin/Sulph	sxt	1536	29.980	3.1030	6	41
Ac. Nalidixico	na	1535	24.453	2.4115	6	32
Tetraciclina	te	1545	22.254	3.1299	6	37
Cloranfenicol	C	1538	25.964	2.5507	6	38

Figura 2. Relación con respecto al punto de corte para resistencia de los aislamientos de *E. coli* genérica frente a los antimicrobianos probados.



Las cajas contienen el rango intercuartílico y muestran la mediana; los bigotes marcan los extremos de los datos globales, no superando una vez y media la amplitud de la caja, por lo cual algunos registros caen fuera, indicándose por puntos (outliers). Los números expresan los mm del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Los resultados categorizados según los puntos de corte del NCCLS se muestran en tabla VIII. Cuando los valores categorizados se proyectan a la población estos valores de resistencia se incrementan levemente como se observa en la tabla IX.

Tabla VIII Resultados categorizados de las pruebas anti-microbianas realizadas en los aislamientos de *E. coli* genérica.

Antimicrobiano		Porcentajes			Obsv
		Resistencia	Intermedios	Susceptible	
Ampicilina	am	2%	8%	90%	1547
Amoxilina	amc	0%	9%	91%	1506
Ceftiofur	xnl	0%	0%	100%	1578
Estreptomina	s	3%	17%	80%	1549
Gentamicina	gm	0%	0%	100%	1545
Sulphasozasola	g	0%	0%	99%	1547
Trimetoprin/Sulph	sxt	0%	0%	100%	1536
Ac Nalidíxico	na	0%	1%	99%	1535
Tetraciclina	te	2%	5%	93%	1545
Cloranfenicol	c	1%	0%	99%	1538

Tabla IX. Resultados categorizados de las pruebas antimicrobianas realizadas en los aislamientos de *E. coli* genérica proyectados a la población según el diseño del muestreo.

Antimicrobiano		Porcentajes			Obsv
		Resistencia	Intermedios	Susceptible	
Ampicilina	am	4%	14%	82%	1547
Amoxilina	amc	1%	17%	82%	1506
Ceftiofur	xnl	0%	2%	98%	1578
Estreptomina	s	8%	20%	72%	1549
Gentamicina	gm	0%	0%	100%	1545
Sulfasozasola	g	0%	3%	97%	1547
Trimetoprin/Sulph	sxt	1%	0%	99%	1536
Ac Nalidíxico	na	3%	0%	97%	1535
Tetraciclina	te	4%	12%	84%	1545
Cloranfenicol	c	2%	0%	98%	1538

No se observaron asociaciones significativas entre el tipo de producción y los grupos de las cefalosporinas (ceftiofur), la gentamicina del grupo de los aminoglicósidos, las sulfonamidas combinadas (trimetoprim/ sulfametoxasole) y el cloranfenicol. En estos 2 últimos casos se observaron diferencias por la prueba de Kruskal-Wallis.

De las tablas X a la XV inclusive se reportan las asociaciones entre los giros productivos y cada uno de los antimicrobianos que mostraron asociaciones significativas. Los antimicrobianos asociados fueron: ampicilina y amoxilina por las penicilinas, estreptomina por los aminoglicosidos, sulfasozasole por las sulfas, ácido nalidíxico por los quinolones y la tetraciclina. Los mayores contrastes se observan entre el giro lechero y los feedlots.

Tabla X Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la ampicilina

Ampicilina	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lecheria	
Resistente	3 2.70	15 1.84	17 2.74	35 2.26
Intermedio	13 11.71	79 9.68	33 5.32	125 8.08
Susceptible	95 85.59	722 88.48	570 91.94	1,387 89.66
Total	111 100.00	816 100.00	620 100.00	1,547 100.00

Pearson $\chi^2(4) = 12.3002$ Pr = **0.015**
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
 χ^2 -squared = 26.332 with 2 d.f.
probability = **0.0001**

Tabla XI. Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la amoxicilina.

Amoxicilina	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lecheria	
Resistente	0	3	3	6
	0.00	0.39	0.48	0.40
Intermedio	11	87	37	135
	9.91	11.23	5.97	8.96
Susceptible	100	685	580	1,365
	90.09	88.39	93.55	90.64
Total	111	775	620	1,506
	100.00	100.00	100.00	100.00

Pearson $\chi^2(4) = 12.3176$ Pr = **0.015**
Prueba exacta de Fisher = **0.009**
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
 χ^2 -squared = 10.802 with 2 d.f.
probability = **0.0045**

Tabla XII. Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la estreptomicina.

Streptomicina	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lecheria	
Resistente	5	26	11	42
	4.50	3.18	1.77	2.71
Intermedio	23	165	78	266
	20.72	20.20	12.56	17.17
Susceptible	83	626	532	1,241
	74.77	76.62	85.67	80.12
Total	111	817	621	1,549
	100.00	100.00	100.00	100.00

Pearson $\chi^2(4) = 20.8934$ Pr = **0.000**
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
 χ^2 -squared = 5.795 with 2 d.f.
probability = 0.0552

Tabla XIII Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la sulfasozasola.

Sulphasozasola	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lecheria	
Resistente	2 1.80	1 0.12	4 0.64	7 0.45
Intermedio	0 0.00	5 0.61	0 0.00	5 0.32
Susceptible	109 98.20	809 99.26	617 99.36	1,535 99.22
Total	111 100.00	815 100.00	621 100.00	1,547 100.00

Pearson chi2(4) = 11.4330 Pr = **0.022**
Prueba exacta de Fisher = **0.021**
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
chi-squared = 13.263 with 2 d.f.
probability = **0.0013**

Tabla XIV Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la ácido nalidíxico.

Ac.Nalidixico	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lecheria	
Resistente	1 0.91	5 0.62	0 0.00	6 0.39
Intermedio	1 0.91	1 0.12	7 1.13	9 0.59
Susceptible	108 98.18	802 99.26	610 98.87	1,520 99.02
Total	110 100.00	808 100.00	617 100.00	1,535 100.00

Pearson chi2(4) = 10.5618 Pr = **0.032**
Prueba exacta de Fisher = **0.009**
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
chi-squared = 12.137 with 2 d.f.
probability = **0.0023**

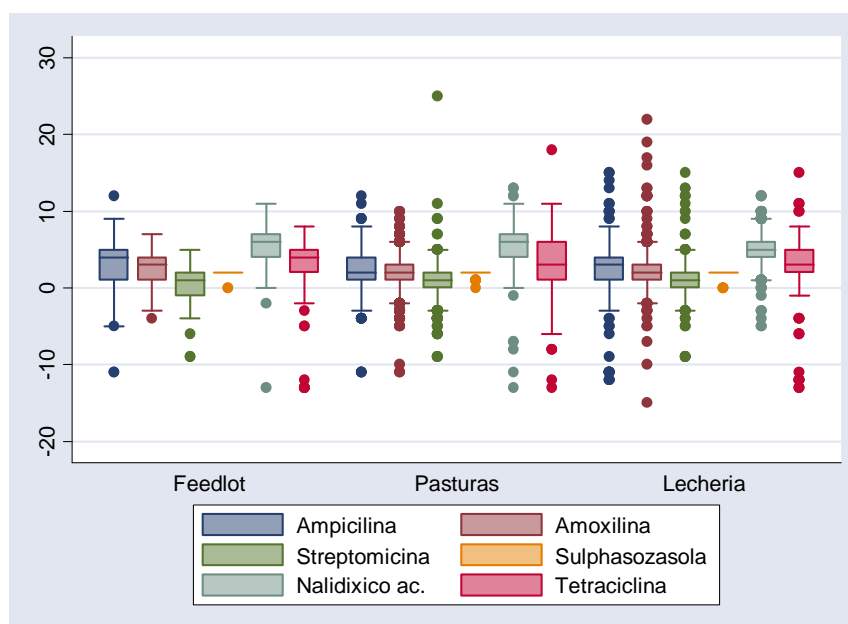
Tabla XV. Relación entre el giro de producción y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la tetraciclina

Tetraciclina	giro			Total
	Feedlot	Pasturas	Lechería	
Resistente	9 8.18	14 1.71	9 1.46	32 2.07
Intermedio	8 7.27	58 7.10	8 1.29	74 4.79
Susceptible	93 84.55	745 91.19	601 97.25	1,439 93.14
Total	110 100.00	817 100.00	618 100.00	1,545 100.00

Pearson $\chi^2(4) = 50.0671$ Pr = 0.000
Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)
 χ^2 -squared = 0.000 with 2 d.f.
probability = 0.9999

En la figura 3 se observa que las diferencias sustantivas caen por el lado de datos aislados (outliers).

Figura 3. Relación con respecto al punto de corte para resistencia de los aislamientos de *E. coli* genérica frente a los antimicrobianos que mostraron asociación con los giros de producción para cada uno de ellos.



Cuando se probaron todas las posibles asociaciones tomando en cuenta el diseño del muestreo, sólo fue significativa la que se plantea en la tabla XVI con respecto a la tetraciclina

Tabla XVI Relación entre el giro de producción de los establecimientos y la clasificación de resistencia de las cepas de *E. coli* genérica aisladas frente a la tetraciclina según el diseño del estudio.

pweight:	peso	Number of obs	=	128
Strata:	giro	Number of strata	=	3
PSU:	farm	Number of PSUs	=	128
		Population size	=	3118.0001

giro	Tetraciclina		
	Suscepti	Resistente	Total
Feedlot	84,61538 (10,41543)	15,38462 (10,41543)	100,00000
	11,00000	2,00000	13,00000
Pasturas	100,00000	0,00000	100,00000
	90,00000	0,00000	90,00000
Lecheria	100,00000	0,00000	100,00000
	25,00000	0,00000	25,00000
Total	99,93586 (0,04343)	0,06414 (0,04343)	100,00000
	126,00000	2,00000	128,00000

Pearson: Uncorrected	chi2(2)	=	19.6228
Design-based	F(1, 125)	=	441.4703
			P = 0.0000

En el análisis de la resistencia a nivel de los establecimientos productores se clasificaron los mismos en función de sus valores medios de aislamiento y como caía ese valor en relación a los valores de referencias NCCLS. De todos los grupos de antimicrobianos estudiados sólo en 3 de ellos se clasificó algún establecimiento como resistente, dado que la media de sus aislamientos cayó en el área de resistencia, los resultados proyectados a la población se observan en la tabla XVII. Considerando el caso extremo de clasificar como resistente un establecimiento con una sola cepa resistente aislada se presenta los resultados en la tabla XVIII.

Tabla XVII. Porcentaje de establecimientos esperados en la población, calificados como resistentes, en función de sus valores medios en la muestra de antibiogramas y sus correspondientes error estándares (EE)

Antimicrobiano		Feedlot		Pasturas		Lechería		TOTALES	
		% Resist.	EE	% Resist.	EE	% Resist.	EE	% Resist.	EE
Ampicilina	am	7,69	7,69	1,11	1,11	0	---	1,13	1,09
Estreptomicina	s	0	-----	1,11	1,11	0	---	1,09	1,09
Tetraciclina	te	15,38	10,42	0	-----	0	---	0,06	0,04

Tabla XVIII. Estimación de establecimientos con el aislamiento de al menos una cepa resistente, expresados en porcentajes con sus correspondientes errores estándares (EE).

Antimicrobiano		Resistentes	EE	Obs
Ampicilina	am	10,16	3,13	128
Amoxilina	amc	3,45	1,92	126
Ceftiofur	xnl	1,48	1,42	128
Estreptomicina	s	16,81	3,89	128
Gentamicina	gm	0,00	-----	128
Sulphasozasola	g	1,20	1,10	128
Trimetoprin/Sulph	sxt	3,36	1,87	128
Ac Naxilico	na	3,32	1,87	128
Tetraciclina	te	9,13	2,97	128
Cloranfenicol	c	2,28	1,54	128

La expresión fenotípica de las 85 cepas resistentes aisladas se observa en la tabla XIX. Se puede observar 23 combinaciones diferentes de resistencia, la más alta frecuencia corresponde a una mono resistencia 69% (59/85), en segundo lugar tenemos las resistencias a 2 agentes 13% (11/85), seguidas por las de 3 agentes 8% (7/85) y con más de 3 agentes el complemento de 8% (7/85). Sólo una de las cepas aisladas fue resistente a 6 anti-microbianos. Mirados individualmente los antimicrobianos que generaron más resistencia son: estreptomicina 47%, ampicilina 38% y tetraciclina 32%, de los aislamientos con resistencia.

Tabla XIX. Expresión fenotípica de las cepas resistentes de *E. coli* genérica, frecuencias y porcentajes.

Categoría	Freq.	Percent	Cum.
Susceptibles	1465	94,52	94,52
S	30	1,94	96,45
AM	15	0,97	97,42
TE	11	0,71	98,13
NA	2	0,13	98,26
SXT	1	0,06	98,32
AMC	1	0,06	98,39
AMC & AM	3	0,19	98,58
AM & TE	2	0,13	98,71
AM & NA	1	0,06	98,77
AM & SXT	1	0,06	98,84
AM & S	1	0,06	98,90
TE & S	2	0,13	99,03
TE & SXT	1	0,06	99,10
AM, TE & C	2	0,13	99,23
AM, AMC & C	1	0,06	99,29
AM, NA & C	1	0,06	99,35
AM, S & TE	1	0,06	99,42
S, G y TE	2	0,13	99,55
AM, S, NA & TE	1	0,06	99,61
AM, S, G, TE & C	3	0,19	99,81
AM, S, G, TE & SXT	1	0,06	99,87
AM, AMC, SXT, NA & C	1	0,06	99,94
AM, XNL,S, G, TE & C	1	0,06	100,00
Total	1550	100,00	

IV. DISCUSIÓN

Los controles de calidad con relación al estándar *E. coli* ATCC® 25922 fueron aceptables. En aquellos casos que alguno de los antimicrobianos salió del rango recomendado, se procedió a la repetición de la prueba y en caso de confirmarse el resultado el medio fue desechado. Para las pruebas de resistencia con *E. coli* sólo se consideraron los controles con la *E. coli* ATCC® 25922 estándar.

El comportamiento de las cepas aisladas mostró buena sensibilidad lo que se ve claramente a través de la figura 2.. Exceptuando a la estreptomycin, que muestra una sensibilidad del 80% (tabla VIII), la susceptibilidad para el resto de los agentes antimicrobianos es en todo los casos superiores al 90%, y cuando se proyecta su resultado a la población se deprime un poco pero sin cambiar el concepto. Podemos esperar encontrar a nivel poblacional hasta un 8% de resistencia para el caso de estreptomycin (tabla IX).

En general se observó independencia entre los giros de producción y el comportamiento de algunos de los agentes antimicrobianos. Esto se observó para los grupos de las cefalosporinas (ceftiofur), la gentamicina del grupo de los aminoglicósidos, las sulfonamidas combinadas, (trimethoprim/ sulfametoxazole) y el cloranfenicol. Esto significa que el manejo de ninguno de los sistemas productivos, contribuyó en forma diferencial para el desarrollo de resistencia para estos agentes. Por otro lado sí se observó la presencia de agentes cuyo comportamiento no fue independiente de los sistemas productivos. En este grupo se encuentran: ampicilina y amoxicilina por las penicilinas, estreptomina por los aminoglicosidos, sulfosozazole por las sulfas, ácido nalidixico por los quinolones y la tetraciclina. Observando las tablas X a XV donde se reportan estas asociaciones estadísticas, no se observa un patrón común para las mismas. Esto puede ser debido a que haya un uso distintivo de los agentes según los sistemas, o que se trate de asociaciones ficticias, hipótesis que se considera más factible ya que cuando se toma en cuenta el diseño del muestro en su mayoría desaparece con la única excepción de las tetraciclinas (tabla XVI). La lógica indica que los diferentes sistemas productivos deben realizar un uso distintivo de los antimicrobianos los cuales de esta forma pueden seleccionar para resistencia en forma diferencial. Estas asociaciones encontradas deben ser tomadas como generación de hipótesis para estudios más profundos que relacionen el uso comercial de antimicrobianos con la presencia de resistencia. De todas formas los niveles de resistencia encontrados son los esperables en una población con una baja exposición a estos agentes.

El comportamiento de los establecimientos mostrado en la tabla XVII, muestra una mayor resistencia en establecimientos con producción “feedlot” para los casos de ampicilina y tetraciclina. De las diferencias planteadas la única que es estadísticamente significativa es la última (tetraciclina), con un valor de $F_{1, 125}$ corregido por el diseño de 441,47 lo que da un valor de $p < 0,01$ (tabla XVI). Si se observa el escenario más pesimista planteado en el cuadro XVIII, los agentes son los mismos y se destaca la la estreptomina por su mayor difusión. No obstante este escenario “muy poco probable” nos muestra que la gran mayoría de establecimientos no tienen ninguna presencia de cepas resistentes.

En un estudio de cohortes realizado en seis establecimientos lecheros, sobre terneras y dividiendo los animales en clusters se encontró que era más frecuente la resistencia a tetraciclinas, sulfisoxazole, sulfa-trimetropin y estreptomina, hallándose una asociación entre la resistencia y la administración previa de antibióticos (Berge et al., 2005).

En un trabajo realizado a nivel de plantas de faena en República Checa, se tomó material de la superficie de la carcasa, procurando definir los fenotipos resistentes de bacterias utilizadas como indicadores de la contaminación del animal. Así, se aisló *E. coli* en el 43.3% de las muestras y se asoció significativamente con su presencia en los cortes cárnicos. El 73% de los aislamientos de *E. coli* resultó resistente, y el 59% de éstos lo fue a la estreptomina (Schlegelová et al., 2004)

En Estados Unidos funciona un Programa de vigilancia multidisciplinario, el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antibiótica para bacterias entéricas (NARMS-EB), una de cuyas secciones estudia las poblaciones animales sanas a nivel de predio, encontrándose en los últimos años altos porcentajes de resistencia para tetraciclina, estreptomina y sulfametoxazole (NARMS, 2005), en niveles que repetidamente se

sitúan entre un 30 a 40%, y aún más. Este patrón se repite aproximadamente en los muestreos a nivel de planta, y aumentan cuando se estudian animales enfermos, agregándose en este caso la ampicilina con porcentajes altos de resistencia. El análisis fenotípico de las resistencias en el presente estudio, muestra que las múltiples están en el entorno del 30%, lo cual es un valor inferior al presente en otros países, tabla XIX. Este no parece ser un factor de preocupación en lo inmediato donde sólo un 1,6 % de los aislamientos totales presentaron resistencia múltiple; como contraste la AVMA se preocupa al observar una tendencia en aumento a la resistencia múltiple en los EEUU. Es así que para todos los aislamientos de *Salmonella* se pasó de un 25% de resistencia múltiple en 1997 a un 40% en 1998 y la resistencia a 5 o más antimicrobianos pasó de 11% a 18% en los mismos años (AVMA, 2002). En otro reporte sobre *E. coli* el 67.6% de los aislamientos con resistencia fueron múltiples (Wagner, 2003) frente a nuestro 30%. En ese mismo estudio el 66,4% de los aislamientos fueron susceptibles a todos los antimicrobianos frente a nuestro 94,62%, con la salvedad de que ellos probaron frente a 17 antimicrobianos lo cual puede incrementar en alguna medida la detección.

V. CONCLUSIONES

Los niveles de resistencia antimicrobiana de bacterias comensales del tubo digestivo de bovinos, utilizadas como indicadores del potencial riesgo de transmisión de esta característica a gérmenes que contaminen al ser humano, es baja. Estos resultados adquieren más valor como factor de seguridad del producto final, si se comparan con los hallazgos obtenidos en otras regiones del mundo, donde el problema de la resistencia a los antimicrobianos ha generado preocupación en varios sectores de su población.

El análisis fenotípico de las resistencias encontrado indica que las resistencias múltiples están en el entorno del 30%, constituyendo menos del 2% de todos los aislamientos. Este es un valor muy inferior al presente en otros países, donde este tipo de bacterias multiresistentes alcanza valores altos y con tendencia a aumentar.

Sin embargo, aunque los resultados sobre resistencia a los antimicrobianos no son en este momento preocupantes en nuestras condiciones, se debe continuar monitoreando la situación como es recomendado por la OMS (WHO, 1997). De esta forma se podrá detectar a tiempo cambios en estos patrones y por otro lado promocionar un manejo prudente de los agentes antimicrobianos.

En conclusión, esta información puede contribuir favorablemente para posicionar aún mejor nuestras carnes en los mercados consumidores, ya que le agregan un valor de seguridad en el capítulo de la inocuidad alimentaria que es de preocupación a nivel global.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup F.M. & Seyfarth A.M. (2000). Effect of intervention on the occurrence of antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93: 99-103
2. AHI (2000). "Survey indicates most antibiotics used in animals are used for treating and preventing disease." Animal Health Institute. Press release. February 14. Online at www.ahi.org
3. Anderson R.M. (1999). The pandemic of antibiotic resistance. *Nature Medicine* 5: 147-149
4. APUA (2005). Executive summary: global antimicrobial resistance alerts and implications. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 41 (Suppl. 4): 221-223.
5. ASM. (2000). "Antimicrobial resistance: An ecological perspective." American Society for Microbiology. Online <http://www.asmtusa.org/acasrc/acal.htm>
6. AVMA Center for Information Management. 2002. Judicious use of antimicrobials for beef cattle veterinarians. AVMA Public Resource Center. <http://www.avma.org/scienact/jtua/cattle/jtuabeef.asp>
7. Berge A.C.B., Atwill E.R., Sisco W.M. (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev. Vet. Med.* 69: 25-38.
8. Berkowitz F. (1995) Antibiotic resistance to bacteria. *Southern Medical Journal* 88:797-804
9. Ferber, D. (2000) Superbugs on the hoof?. *Science* 288 :792-794
10. Gorbach S.L. (2001). Antibiotic use in animal feed- Time to stop. *New Eng. J. Medicine* 345:1202-1203
11. Howard D.H. & Scott R.D. II (2005). The economic burden of drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 41 (Suppl. 4): 283-286
12. Levy S.B. (1998 a). Multidrug resistance – a sign of the times. *N. Eng. J. Med.* 338: 1376-1378
13. Levy S.B. (1998 b). The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American March* 1998, 46-53
14. Martel J., Tardy F., Sanders P., Boisseau J. (2001). New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Vet. Res.* 32: 381-392
15. Mellon M., Benbrook C., Benbrook K.L (2001). *Hogging it : estimates of antimicrobial abuse in livestock.* Cambridge, Mass. : Union of Concerned Scientist
16. Moller F. & Seyfarth A.M. (2000). Effect of intervention on the occurrence of antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93, 99-102.
17. NARMS (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from 1998-2003. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. On line: www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/66120508/NARMS/percent_resistance/ecoli_pr.pdf
18. NCCLS. (1999) National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved Standard. NCCLS document M31-A. ISBN 1-56238-377-9. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.

19. Radostits O.M. (2000). Does the use of antimicrobials in beef cattle health management and production promote the development of antimicrobial resistant pathogens and their transfer to humans causing disease which is difficult to treat? Proceedings of XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay
20. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Mc Gee, H.B. Wells, J.G. Davis, B.R. Hebert, R.J. Olcott, E.S. Johnson, L.M. Hargrett, N.T. Blake, P.A. Cohen, M.L.(1983). Hemorrhagic *colitis* associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New England J. of Medicine. 308:681-685.
21. Schlegelová J., Nápraníková E., Dendis M., Horváth R., Benedík J., Babák V., Klímová E., Navrátilová P., Sustáckova A. (2004). Beef carcass contamination in a slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species. Meat Science 66:557-565.
22. Schwarz S. & Chaslus-Dancla E.(2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet. Res. 32: 201-225
23. Sørum H. & Sunde M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet. Res. 32: 227-241
24. Spika J.S., Waterman S.H, Soo Hoo G.W., St. Louis M.E., Pacer E.R., James S.M., Bissett M.L., Mayer L.W., Chiu J.Y., Hall B., Greene K., Potter M.E., Cohen M.L., Blake P.A.(1987). Chloranfenicol- resistance *Salmonella newport* traced through hamburguers to dairy farms. N. Engl. J. Med. 316: 565-570
25. StataCorp. 2003. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: StataCorp LP
26. Tenover F. & Hughes J. (1996). The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. Journal of the American Association 275:300-304
27. Threlfall E.J., Ward L.R., Frost J.A., Willshaw G. A. (2000). Spread of resistance from food animals to man – the UK experience. Acta Vet. Scand. Suppl. 93:63-69.
28. Wagner B.A., Salman M.D., Dargatz D.A., Morley P.S., Wittum T.E., Keefe T.J. (2003). Factor analysis of minimum-inhibitory concentrations for *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle to model relationships among antimicrobial-resistance outcomes. Prev Vet Med 57:127-139
29. Wall P.G., Morgan D., Lambden K., Griffin M., Threlfall E.J., Ward L.R., Rowe B. (1995).Transmission of multiresistance salmonella typhimurium from cattle to man. Vet. Rec. 136: 591-592
30. Walsh Ch. (2003). Antibiotics. Actions, origins, resistance. ASM Press, Washington, DC. 336 pp
31. Wegener H.C. & Frimond-Møller N. (2000). Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. J. Med. Microbiol. 49: 111-113
32. White D.G., Zhao S., Sudler R., Ayers S., Friedman S., Chen S., McDermont P.F., McDermont S., Wagner D.D. Meng J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345: 1147-1154
33. WHO. (1997) Medical impact of antibiotic use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlin, germany,13-17 October 1997
WHO/EMC/ZOO/97.4

34. WHO (2000). WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO Consultation with the participation of the FAO and the OIE, Geneva, 5-9 June 2000
35. Wierup M. (2000). Disease preventive methods as alternative and complements to use of antibiotics. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93, 135-142
36. Williams R. (2000). The impact of antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93: 17-21.
37. Witte W. (1998) Medical consequence of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.
38. Witte W., Tschape H., Klare I., Werner G. (2000). Antibiotics in animal feed. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93:37-45

CONCLUSIONES FINALES

La cobertura lograda por este estudio es de carácter nacional tal como fuera planteado, alcanzándose también la representatividad de la población objetivo “novillos próximos a la faena”, a través del método de muestreo utilizado. La cobertura de los feedlot fue prácticamente total, salvo un productor que se negó a participar. Se logró una buena representación de los establecimientos típicos de producción de carne sobre pasturas y de aquellos dedicados a la producción de leche que tienen como actividad complementaria engordar novillos para faena. Sólo se detectó un establecimiento con animales positivos a la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y en consecuencia el número de establecimientos positivos que se puede esperar en el Uruguay es del $0,05\% \pm 0,05\%$. Este agente sólo pudo ser aislado de un pool de 5 muestras, con una proyección a la población de $0,008\% \pm 0,008\%$, siendo estos datos mucho menos significativos que los hallados en trabajos realizados en los países industrializados.

Sólo se pudo aislar *Salmonellas* spp. en 5 de los 133 establecimientos muestreados, los cuales fueron en los cinco casos predios con animales de carne mantenidos sobre pasturas. La proyección a nivel de población indica que se puede esperar aislar este agente de aproximadamente un 5% de los establecimientos con un error de $\pm 2\%$. La prevalencia en los animales alcanzó con datos proyectados a la población el $0,13\% \pm 0,07$, ya que se encontraron 9 bovinos positivos en casi 6 mil muestras, lo cual es un valor comparativamente muy bajo, con los resultados obtenidos en estudios de otras regiones geográficas.

Si bien es importante tener en cuenta que la ausencia de las bacterias no significa necesariamente la inexistencia de contaminación final del producto. Ya que esta contaminación se podría producir en la planta de faena, en el manipuleo del producto, en la distribución a los puestos de venta y aún en los procesos de preparación de alimentos. Las evidencias muestran una asociación entre serotipos excretados por animales y los causantes de brotes de enfermedad humana. En consecuencia, la baja frecuencia de aislamientos en los animales como materia prima, es de vital importancia para obtener un producto saludable dado que la potencial fuente de los agentes está en su mayoría libre de los mismos.

Este estudio permite concluir que la prevalencia de los agente en estudio es relativamente muy baja en los establecimientos ganaderos, por lo cual si el procesamiento en la cadena de producción de carne es adecuado el riesgo para el consumidor no es significativo. Estos resultados son un insumo para un potencial análisis de riesgo de los productos cárnicos del Uruguay.

El comportamiento de las cepas aisladas mostró en general buena sensibilidad a los fármacos antimicrobianos, siendo superior al 90%, en nueve de las diez drogas estudiadas. La estreptomocina mostró una susceptibilidad del 80%, lo cual resulta un poco menor a lo ya expresado. En general se observó independencia entre los giros de producción y el comportamiento de algunos de los agentes antimicrobianos. Esto significa que el manejo de los sistemas productivos, no contribuyó en forma diferencial para el desarrollo de resistencia hacia estos agentes. Los niveles de resistencia encontrados son los esperables en una población con una baja exposición a las drogas antimicrobianas. El análisis fenotípico de las resistencias muestra que las múltiples están en el entorno del 30%, lo cual es un valor inferior al presente en otros países.

Esta información puede contribuir favorablemente a posicionar aún mejor nuestras carnes en los mercados consumidores, ya que le agregan valor en la temática que refiere a la inocuidad, materia que actualmente es de preocupación a nivel global. A su vez las conclusiones resultantes del presente estudio brindan un marco de seguridad para los consumidores locales de los productos cárnicos en lo que refiere a las enfermedades de transmisión alimentaria. Queda demostrando el bajo riesgo que implica el consumo de tales componentes de la dieta, como vehículos de infecciones para el hombre o factores que faciliten la aparición y diseminación de resistencia a los antimicrobianos.