USO ESTRATEGICO DEL LABORATORIO : Como usar las pruebas del laboratorio en una hipótesis.

D. Hancock

RESUMEN

Semánticamente hablando «diagnóstico» usado con referencia a hallazgos microbiológicos y patológicos no es lo que buscamos en investigación de enfermedad de un rodeo. La resolución de los problemas en las explotaciones pecuarias requiere de diagnósticos epidemiológicos en los cuales se identifique los puntos críticos de control. Los diagnósticos de laboratorio pueden ser importantes como complemento de los esfuerzos para resolver los problemas, pero solamente si son usados estratégicamente para probar hipótesis sobre determinantes clave.

¿Cómo reaccionamos frente a un problema de un rodeo con muchas enfermedades ?. La Respuesta parece elemental. Muestreamos los animales enfermos y muertos y definiendo los agentes infecciosos y/o los procesos patológicos, determinamos lo que está causando el problema. Solamente encontrando la causa podemos esperar llegar a una solución. Por lo menos, éste es un dogma aceptado por el uso. Este enfoque asume que las causas de este exceso de enfermedad en las poblaciones son principalmente externas y llegan a las explotaciones pecuarias sin que estas participen del proceso. Bajo este aserto, el veterinario funciona sólo como un correo, enviando las muestras y esperando que la respuesta y el correcto elixir o vacuna lleguen por vía de retorno.

En la Unidad de Investigación Diagnóstica de Campo de la Universidad de Washington consideramos cinco escenarios que intentan crear duda acerca del modo de investigación «entrega personal veterinaria» y planteamos una de alternativa.

Escenario 1.- Se trajeron para practicar necropsia 5 novillos de un feedlot de 18.000 cabezas. Ellos eran representativos de aproximadamente 200 casos que habían ocurrido los dos últimos meses. Los novillos primero mostraron signos respiratorios y luego de varios días, diarréicos. Cerca de la mitad de los casos las heces contenían sangre y fibrina. Se encontró ***Salmonella typhimurium*** en varios tejidos de los 5 novillos y se observaron lesiones características de salmonellosis enteropática. En 3 de los animales se encontraron lesiones de una bronconeumonía fibrinosa en resolución. Se logró el diagnóstico de laboratorio. ¿Estuvo la solución a manos ? No.

Escenario 2.- Un rodeo lechero tuvo un grave problema de diarrea en terneros. La morbilidad se acercó al 100% y la mortalidad ha sido de un 25%. Se han enviado numerosas muestras de materia fecal para diagnóstico de laboratorio las que revelaron la presencia de rotavirus, coronavirus y crystosporidios. En la necropsia, no se encontraron grandes lesiones para remarcar -solo emasiación y deshidratación-. Un hallazgo común fue la presencia de atrofia de la s vellosidades del intestino delgado. Se logró un diagnóstico de laboratorio. ¿Estaba la solución a mano ? NO.

Escenario 3.- Un rodeo de cría tuvo una alta tasa de terneros débiles muchos de los cuales murieron poco después del nacimiento. El tiempo había sido bastante frío. Dos de los terneros habían sido necropsiados. En ellos se observaron lesiones correspondientes a exposición (estrés por frío). No se observaron ni agentes infecciosos ni lesiones correspondientes a procesos infecciosos. Se logró un diagnóstico. ¿Estaba a mano la solución ?. NO.

Escenario 4.- Un rodeo lechero había tenido un perpetuo problema con las mastitis clínicas. Más aún, el contaje celular de la leche del tanque había venido aumentando durante los pasados 15 meses y estaba peligrosamente cerca del límite para el grado A. Se enviaron muestras de 12 de los casos clínicos. Se identificó ***Staphylococcus aureus***. Se logró un diagnóstico. ¿Estaba a mano la solución ?. NO.

Escenario 5.- Ocurrió un severo brote de neumonía en un feedlot. La necropsia e histopatología de 4 animales muertos revelaron lesiones correspondientes a bronconeumonía fibrinosa. Se aisló Pasteurella haemolytica de los pulmones de los 4 terneros muertos y de las narinas de 7 de 12 casos clínicos. Se tomaron muestras serológicas pareadas recogidas en el período agudo recogidas y dos semanas después, revelando amplia seroconversión del virus de IBR del PI3 y del BRS. Se logró un diagnóstico. ¿Estaba a mano la solución ?. NO.

En cada uno de los escenarios antes mencionados se obtuvo un diagnóstico de laboratorio tan sólido y defendible como el que es posible lograr. Lo que está faltando, si es que hay que encontrar una solución, es saber en que difieren las explotaciones pecuarias afectadas de otras similares, que no tienen problemas de este tipo. Consideraremos algunas preguntas no respondidas :

Escenario 1 .- Multitud de animales entran en un feedlot cada mes, unos pocos están inevitablemente infectados con salmonella. También entre los miles de cargas de camión de alimento que se reciben anualmente, alguna es posible que esté contaminada con salmonella. Estas fuentes existen en todos los feedlots, pero la mayoría no tienen brotes de salmonellosis. ¿Qué es diferente aquí ? ¿Cómo y por qué se está extendiendo la infección ?¿Cuál es el reservorio ?. Nótese que el muestreo de los novillos muertos no responde ninguna de estas preguntas fundamentales.

Escenario 2 : Los agentes de la diarrea de terneros están presentes en todos los tambos (y rodeos de cría).
La infección con algunos de los agentes de la diarrea toma fundamentalmente los tres mencionados arriba, es universal en los terneros de tambo y generalmente es subclínica o pasa desapercibida. ¿ Qué es lo diferente en este rodeo ?. Nótese que el muestreo de los novillos muertos no responde a esta pregunta fundamental.

Escenario 3 : El tiempo frío estuvo presente en toda la región y sin embargo la mayoría no experimentó una alta tasa de pérdida de terneros. ¿Qué es lo peculiar en esta explotación ? Nótese que el muestreo de los terneros muertos no responde a esta pregunta fundamental.

Escenario 4 : ***Staphylococcus aureus*** está presente en la mayoría de los rodeos. ¿Qué factores están involucrados en esta difusión contínua que llega a proporciones epidémicas en este rodeo ? Nótese que el cultivo de las muestras de leche no responde a esta pregunta fundamental ?

Escenario 5 : Cepas virulentas de ***Pasteurella haemolytica*** están presentes en todos los grupos de bovinos. La infección con virus respiratorios es sumamente común en los animales de feedlot de reciente ingreso. Esto es verdad tanto en grupos de bovinos que no tienen brotes de enfermedad respiratoria como en aquellos que sí los tienen. ¿Qué es lo

diferente en el ganado que está sufriendo el brote ?¿Qué factores en este feedlot favorecen una excesiva tasa de enfermedad respiratoria ? Nótese que los cultivos bacterianos, la histopatología y virología no responden a estas preguntas fundamentales.

Tabla 1.- Significados diferentes de «diagnóstico»

DIAGNÓSTICO	META	PREGUNTA CENTRAL
Clínico	Definir problemas en individuos	Descriptivamente, ¿Cómo difiere este individuo de lo normal ?
Laboratorio	Definir agentes y patologías asociadas en individuos	Homeostáticamente: ¿Cómo difiere este individuo de lo normal?
Epidemiológicos:	.....	.....
Descriptivo	Definir problema en la población	Descriptivamente, ¿en qué difiere esta normal ?
Ecológico	Identificar determinantes claves (= puntos críticos de control)	Homeostáticamente: ¿en qué difiere esta población de lo normal ?

El término «diagnóstico» puede ser un obstáculo en los problemas sanitarios del rodeo. Se usa en varios contextos diferentes (tabla 1), solamente uno de los cuales está apuntado directamente a la solución de los problemas del rodeo. La meta última en el diagnóstico epidemiológico es la idaentificación de los factores de riesgo sobre los cuales tenemos control y los cuales pueden se manejados en un esfuerzo para controlar y evitar la enfermedad. Tales factores de riesgo se denominan **determinantes claves** o sinonímicamente, **puntos críticos de control.** Por ejemplo, saber que los determinantes claves para un exceso de morbilidad-motalidad por diarrea en un tambo, residen en las amplias áreas de alojamiento, nutrición e inmunidad pasiva. La identificación de los patrones temporales y de grupos de riesgo y la evaluación detallada del manejo son críticas para la identificación de los determinantes clave.
Ahora evalúese con el escenario 5 : 10 de sus buenos clientes con rodeos de cría han comunicado excesivas pérdidas de terneros este año ; según el controlador de semovientes otros rodeos también están teniendo esos problemas. Diseñe una estrategia para resolver el problema y luego lea la estrategia propuesta en la tabla 2.-
No siga antes de delinear una estrategia.

Dos aspectos del escenario 5 y la estrategia propuesta en la tabla 2 merecen considerarse. Primero el nombrar el problema no lo resuelve. El único propósito de los exámenes clínicos y -en la etapa de definición del problema- las remisiones al laboratorio, fue para ayudar a definir el caso individual. Conjuntamente con el límite cuantitativo (por ejemplo : porcentaje de terneros dentro del rodeo o grupo de éstos que han sido afectados) usamos nuestra definición del caso para identificar cuales rodeos o grupos de éstos están afectados y cuales no.
En segundo lugar, las dos preguntas conceptuales más importantes de éste así como de cualquier otra investigación sobre rodeos enfermos son : (1) ¿Cómo difieren los grupos o poblaciones afectadas de ellos mismos cuando están sanos ?. (2) ¿Cómo difieren los grupos o poblaciones de aquellos otros que no están afectados ?. Para intentar contestar estas dos preguntas, nos colocamos en posición para crear una lista de hipótesis. Los items en esta lista deben ser **cosas que puedan ser cambiadas** (por ejemplo puntos críticos de control), no los nombres de agentes infecciosos, toxinas u otras patologías. El enfoque total es directamente comparable a aquel que realizaríamos para investigar un problema patológico en un animal. Necesitamos tener en mente que estamos buscando cosas que puedan explicar la falla de la homeostasis a nivel de rodeo y no a nivel individual. Una vez que tengamos la lista de hipótesis, podemos empezar a considerar el muestreo estratégico apropiado para el laboratorio que debe sernos útil. El muestreo estratégico para el laboratorio es aquel programado para testar las hipótesis sobre manejo. Otra característica es que si Ud. no puede definir un patrón de decisión (este resultado : esta conclusión ; ese resultado : esa conclusión) entonces no es un muestreo estratégico sino un muestreo «para ver que pasa» . Por encima de la tendencia del muestreo «para ver que pasa» que malgasta tiempo y recursos, es sin duda muy difícil planificar la cuantía y selección de individuos a muestrear. En el muestreo estratégico, por el contrario, la planificación inteligente es más fácil ya que las hipótesis sobre nivel de manejo pueden ser sintetizadas en una de estas tres preguntas : ¿Está algún agente o atributo presente en algún grupo o población ? ¿Qué proporción de un grupo o pobla-

Tabla 2.- Esquema propuesta para investigar el problema en el escenario 5.-

I.- Definir .....

A..- ..... el síndrome por edad, clínico, patológico, hallazgos de laboratorio (¿Cuál es el caso ?)
B.- ..... el límite para excesiva pérdida de terneros (¿Cuál es el caso colectivo ?)

II.- Determinar que cambió en el rodeo ; por ejemplo : programa de alimentación , potrero de parición.

III.- Preparar un cronograma de aparición de casos. Comparar con cambios climáticos y de manejo.

VI.- Realizar el análisis de riesgo de grupo.

A.- Entre individuos dentro del rodeo, por ej. : edad de la madre, distocia.
B.- Entre los rodeos afectados y no afectados, por ej. : tipo de forraje (variedad, concentración protéica, etc.), variables del potrero de parición, política de asistencia a las distocias, variables en el suplemento mineral, variables de vacunación, otras muchas posibles.

V.- Preparar un mapa para identificar donde se junta el rodeo o que zona del potrero es la predilecta.
VI.- Plantear hipótesis sobre los determinantes clave ; realización de muestreos estratégicos para envío al laboratorio, recolección de otros datos y/o ensayos tentativos.

Califíquese Ud. mismo : Cada item por separado vale 10 puntos.-

ción posee algún agente o atributo ? Cual es el nivel promedio para algunos atributos cuantitativos en una población o grupo ?.

Lo que sigue es una discusión sobre la determinación del tamaño de las muestras para los tres principales tipos de preguntas. El apéndice contiene tablas para tamaño de muestras.

Muestreo para detectar un atributo.- Uno de sus clientes con ganado de cría que engorda sus propios novillitos se ha venido preocupando porque en el frigorífico ha tenido una alta tasa de decomiso de hígados. En algunos casos se ha encontrado fasciola. Los terneros nacen en el establecimiento del cliente y pastorean un campo arrendado. Ambos potreros se han considerado libres de fasciola, pero Ud. decide analizar las vacas de cría para comprobar la hipótesis de que el campo propio está libre de fasciola. ¿Cuántas debería muestrear ? Si quiere estar seguro (dentro de las limitantes del análisis) de que los bovinos no están parasitados Ud. debería muestrear las 600 vacas. Si por el contrario Ud. quiere preguntar : «¿cuántas debo muestrear de este rodeo de 600 vacas para estar un 95% seguro de encontrar por lo menos un animal positivo si la prevalencia es de 5% o más ?». Entonces puede computarse el tamaño de la muestra que no incluirá el rodeo entero (a menos que éste sea muy pequeño). Cannon y Roe (1) propusieron la siguiente ecuación :

n = (1 - B^ 1/d) x (N - ((d - 1)/2))

donde **n** es el tamaño de la muestra requerida computada y **N** es el tamaño de la población o subgrupo definido de interés, **d** es el número de animales que posee el atributo dentro de la población, **B** es la probabilidad de no incluir positivos en una muestra de tamaño **n y ^** está como exponente. Las fracciones se redondean al entero mayor más próximo.

Los valores tabulados se muestran en el apéndice 1 para 90%, 95% y 99% de certeza. Para el ejemplo de las fasciolas Ud. debería muestrear 56 vacas para estar un 95 % seguro de detectar por lo menos un animal positivo si la prevalencia verdadera fuera del 5%. Si Ud. se contenta con una confianza del 90% Ud. debería muestrear solamente 44 vacas. Si Ud. quisiera una certeza del 95% para detectar un 1% de prevalencia necesitaría muestrear 191 vacas. Por supuesto, Ud. no precisaría analizar todo el ganado muestreado si encuentra una muestra positiva por ejemplo, la número 30 ; podría parar allí.

El muestreo planteado así puede darle mayor fuerza a esos test hipotéticos. Por ejemplo, para probar la hipótesis de que un rodeo está libre de fasciolas el muestrear las vacas viejas podría brindar una certeza mayor ya que éstas habrían estado pastando el potrero contaminado por más tiempo. En tales casos uno sitúa una prevalencia detectable dentro del subgrupo de interés, y luego basado en el tamaño del grupo y en el nivel de certeza deseados, se puede determinar el tamaño de la muestra para el grupo elegido aplicando el apéndice 1 o la ecuación 1.

El empleo de la ecuación 1 o el apéndice 1 para la planificación del muestreo para infecciones transitorias puede ser traicionero. Queremos muestrear dentro de un feedlot para determinar si existe infección por Salmonella. En el ejemplo de prevalencia de fasciola asumíamos que cualquiera fuera la prevalencia en el rodeo, es regularmente estable y será idéntica o muy similar la semana próxima. En el muestreo para infecciones transitorias (Salmonella) la prevalencia de infección observada es una variable caótica significando que cambia diariamente. La prevalencia promedio en un período de una semana puede ser del 10% pero no será igual en todos los momentos dentro de esa semana. Estamos muestreando efectivamente animal instante más que individuos, y por lo tanto debemos usar un tamaño de muestra para poblaciones infinitas. Por ejemplo, para dar un 95% de chance de detectar por lo menos un animal positivo a Salmonella si la prevalencia fuera de 10% necesitaríamos muestrear 29 (apéndice 1).

Muestreo para estimar una proporción.- Ud. está investigando las razones de una históricamente alta de pérdidas neonatales en un gran establecimiento de cría. Ud. estima que es excesiva la falla en la transferencia pasiva entre terneros nacidos dentro de este rodeo de 400 vacas y le gustaría estimar la proporción de terneros de 2 a 7 días con niveles inadecuados de transferencia pasiva (es decir, menores de 500 mg/dl y IgG). ¿Cuántos terneros necesita muestrear para obtener una buena estimación ? . La fórmula para estimar el tamaño de muestra que se necesita es la siguiente :

$$n_1 \sim \frac{Z^2 p(1 - p)}{d^2}$$

$$n \sim \frac{1}{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{N}}$$

donde **n** es el tamaño de muestra requerido, n_1 es el tamaño de la muestra para una población infinita, **Z** es el coeficiente de confiabilidad (1.96 para 95%), **p** es la estimación grosera de prevalencia, **d** es el límite de confianza deseado y **N** es el tamaño de la población o grupo definido para el cual son tomadas las muestras.
Las fracciones son redondeadas hacia arriba.

Ya que la varianza de la estimación de una proporción depende de cuan cerca la proporción esté de 0.5 (la varianza aumenta cuanto más se acerca a 0.50), se debe realizar una estimación bruta de la prevalencia general, inclinándose hacia el conservadurismo. En el presente caso, Ud. se sorprendería si la proporción de transferencia inmunitaria pasiva inadecuada fuera mayor que el 25% del tamaño del rodeo de carne, de aquí que Ud. elija 25% como prevalencia. A continuación, Ud. debe elegir cuan amplio desea que sea el intervalo de confianza y con que nivel de confianza (90%, 95%) . Digamos que Ud. desea establecer una estimación que tiene un 95% de confianza y cuyo límite esté 5 punto en porcentaje a ambos lados de la proporción estimada. En el apéndice 2 b. Ud. encuentra el número 168. Este parece más alto que el número que Ud. tenía en mente así que desea chequear el tamaño de la muestra necesaria para un 10% del punto límite. En el apéndice 2b. Ud. encuentra el número 62. Es bueno que Ud. tenga en cuenta el tamaño de la muestra para realizar sus conclusiones. Ud. se inclinaría a muestrear 10 o 15 terneros que no serían suficientes para sacar alguna conclusión cierta.

Muestreando para estimar un promedio.- Ud. ha hipotetizado que la deficiencia de selenio en un feedlot y muchos casos de neumonía a través del tiempo. Ud. desea estimar el nivel promedio de selenio en sangre total en 200 bovinos recientemente entrados al feedlot. De un muestreo anterior, Ud. estimó que la desviación standard es alrededor de 6 ug/g y Ud. desea estimar el promedio a 3 ug/g. Ud. podría emplear la siguiente ecuación :

$$n_1 \sim \frac{z^2}{d^2}$$

$$n \sim \frac{1}{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{N}}$$

donde **n** es el tamaño computado de la muestra requerida, n_1 y el tamaño de muestra para una población infinita, **Z** es el coeficiente de confianza (ejemplo 1.96 para 95%), d es el límite deseado de confianza expresaddo en fracciones de desviación standard y **N** es el tamaño de la población o grupo definido del cual se extraen las muestras. Las fracciones son redondeadas hacia arriba. Una alternativa para el uso de la ecuación está en el apéndice 3. Para un intervalo de confianza del 95% se encuentra que el tamaño de la muestra es de 15 bajo la columna encabezada 0.50 en el apéndice 3b.

Comentarios prácticos para el uso de fórmulas para tamaño de muestra.- Las tablas de tamaño de muestra no son, estrictamente hablando, esenciales para el muestreo estratégico ; el único hecho crítico es que una hipótesis comprobable sea la base del muestreo. Sin algún conocimiento sobre el tamaño de la muestra muchas de las hipótesis propuestas no podrían ser adecuadamente probadas. Un referencia ocasional sobre las tablas de tamaño de muestra es necesaria para crear un sentido de la magnitud del muestreo que es apropiada para tal fin. Otro beneficio adicional para considerar el tamaño de la muestra es que nos fuerza a establecer nuestra explicación de las hipótesis, a un punto tal que nuestras nociones quedarán en la nada. Es de hacer notar otras fórmulas para el tamaño de muestra algunas de las cuales incluyen variables adicionales para testear sensibilidad y especificidad. Sin duda, los tests imperfectos influirán sobre el tamaño de las muestras que se necesitan, pero incluyendo estimaciones para testear sensibilidad y especificidad crea ecuaciones muy complejas (o muchas páginas de tabla) y requiere estimaciones para las cuales los valores confiables no existen o son muy difíciles de obtener. En el mundo pragmático, nuestras hipótesis deben ser moldeadas en términos de prevalencia o promedios grupales tales como los vemos con los «ojos» de tests imperfectos. También entendemos que hay una inevitable elasticidad para la selección del tamaño de la muestra -sin considerar el grado de la perfección del test- en la cual la elección del nivel de confianza o de la amplitud del límite es de alguna forma arbitraria.

Escenario 1 revisitado.- Como ejemplo de aplicación del muestreo estratégico consideraremos su uso en el problema de salmonellosis descrito en el escenario 1. Aunque esta investigación no fue perfecta en todos los aspectos, sirve para ilustrar como el muestreo de laboratorio estratégico puede ser usado, aún bajo las limitantes de las circunstancias prácticas, para converger en el problema.

El enfoque del veterinario correo habría sído prescribir una vacuna en el feedlot en donde habían aparecido los casos de salmonellosis. Esto no fue realizado debido a la cuestionable eficacia de los biológicos asequibles y el alto costo que hubiera significado vacunar más de 50.000 cabezas por año (3 recambios de 18.000 animales por año). Se decidió el uso de muestreo estratégico para determinar el reservorio y la forma de diseminación co el objetivo de definir los puntos críticos de control. La hipótesis probada en la visita preliminar fue que la salmonella se estaba diseminando primariamente en los corrales problema (aquellos con la morbilidad por encima de lo normal) y no en el feedlot entero o solamente en los corrales hospital. Se recogieron 10 muestras fecales de cada uno de los 4 corrales problema y de 3 adjuntos a ellos (el feedlot tenía 100 corrales). La cuadrilla de tratamiento había casi terminado éstos en el momento de nuestra llegada, y solo pudieron ser muestreados los últimos 14 animales que estaban en el corral hospital. Los tamaños de la muestra aquí, (40 de los corrales problema, 10 de los adjuntos y 14 del hospital) fueron establecidos de acuerdo al material de muestreo disponible y a la capacidad del laboratorio, pero el número de muestras recogidas en los otros corrales (sin incluir al hospital) aseguraban una probabilidad del 95% de detectar un 5% de prevalencia. (Apéndice 1, n = 59)

Las 14 muestras del corral hospital no fueron consideradas óptimas pero se consideró que aún este muestreo limitado podría brindar datos que ayudaran muestreo ulterior. 5 de las 14 muestras de este corral fueron positivas para S. thyphimurium -la totalidad de las cuales arrojaron en el antibiogramas los mismos resultados para aquellas de los animales necropsiados. No se encontraron positivos entre las 70 muestras de los otros corrales.

Esto llevó a una hipótesis corregida de que las infecciones por Salmonella en este feedlot, eran estrictamente hospitalarias, (diseminándose en el corral hospital). La principal alternativa considerada fue que el agente se estaba diseminando en los corrales y que la concentración en el corral hospital era provocada por los recorredores que estaban identificando y sacando los animales enfermos muy rápidamente. Con la hipótesis hospitalaria esperábamos que el muestreo subsiguiente continuaría mostrando que los animales infectados con Salmonella estaban concentrados en el corral hospital. Además, si la hipótesis hospitalara fuera cierta esperábamos que los animales muestreados el día en que eran sacados serían negativos y que habría un aumento en la prevalencia de la infección durante los primeros días de su permanencia en el corral hospital. El muestreo ulterior consistió en 28 muestras fecales por corral en 4 de aquellos en los que la morbilidad estaba por encima del promedio (n = 28 daba una posibilidad grosera del 95% de detectar un 10% de prevalencia), más el muestreo de los que eran llevados al hospital y de todos los animales que estaban en el corral hospital en 2 muestreos con 15 días de intervalo. El cultivo de ll2 muestras de los corrales (28 x 4) reveló 2 (1.8%) positivos a ***S. Thyphimurium***. Se consideró relevante que los animales recuperados fueran devueltos a sus corrales, aunque el uso del hisopo bacteriológico fecal impide concluir hasta donde los animales positivos no se habrían contagiado de anteriores pacientes del hospital. El cultivo de 16 de los recién llevados al hospital reveló que 4 (25%) eran positivos, pero todos eran recaídas de casos anteriores tal como lo señala la caravana blanca que llevaban. Los bovinos que habían estado en el hospital 1 día tuvieron una prevalencia de ***S.Thyphimurium*** de 33% (7/21) aquellos que habían estado 2 días, una prevalencia del 67% (8/12) así como aquellos que habían estado 3 días 10/15) . Los bovinos que habían estado en el hospital durante 4 días o más tuvieron una prevalencia de 56% para ***S. Thyphimurium***.Todos los aislamientos tuvieron el mismo antibiograma que el de los novillos necropsiados y que el de la 1ª visita de muestreo (el perfil de plasmídeos confirmó posteriormente que todos los aislamientos tenían el mismo origen.). Estos datos eran más concordantes con la hipótesis hospitalaria.

La segunda hipótesis fue que la principal vía de diseminación en el hospital era e contacto directo y que ésta diseminación era aumentada por animales de nueva entrada con afección crónica (la falta de segregación basada en los días post-ingreso). Se mostró un esquema de segregación y luego de otras 2 semanas se volvió a examinar la presencia de Salmonella en los bovinos del hospital. Se obseervó patrón muy similar al descrito más arriba -los recién entrados eran negativos, (excepto unos pocos animales con recaída) y la prevalencia aumentó con el tiempo de estadía en el hospital, a tal punto, que la mayoría de los animales estaban infectados al 3er. día de haber ingresado. Se concluyó que la segregación por días post-entrada al hospital no había sido exitosa y que deberían estar operando otros medios de transmisión y no solo el directo de animal a animal.

La principal hipótesis alternativa (transmisión animal -ani-

mal) fue que esta ocurría primariamente a través del equipo de tratamiento. El muestreo de éste en el momento de la 1ª visita había revelado la presencia de ***S. Thyphimurium*** en las tomeras, en la sonda estomacal y lactobacillus en el dispensador de pasta. Se presumió inicialmente que las dosis inoculantes a través de esta ruta eran probablemente una consecuencia menor . También que la dirección del feedlot había estado remisa en implementar un programa de desinfección del equipo de manera de no contaminar otras áreas del feedlot. Pero luego de la falla de segregación se implementó un programa de desinfección que se monitoreó con contínuos cultivos del equipo. El dispensador de pasta se mostró como imposible de desinfectar adecuadamente y fue eliminado de todos los programas de tratamiento. La desinfección fue tan exitosa para el resto del equipo pues no se encontró Salmonella en ninguna parte de éste en los cultivos ulteriores.

Un mes después de la exitosa implementación de la desinfección se detectó un solo animal positivo a Salmonella en el hospital (en el día 2 post-entrada) ; 2 meses después no se encontraron más positivos. Basados en las comunicaciones subjetivas del gerencia del feedlot, el síndrome concordante con salmonellosis clínica declinó casi a cero luego de la adopción del programa de desinfección. La hipótesis de que la diseminación había sido primariamente a través del equipo se consideró como provisionalmente establecida, aunque la evidencia no se consideró concluyente dada la imposibilidad de establecer un grupo control donde no se practicara la desinfección del equipo. También se consideró posible que las infecciones hospitalarias por Salmonella eran normales para todos los feedlots y que el síndrome clínico no estaba relacionado con salmonellosis. Para probar esta hipótesis se muestrearon en 5 feedlots, bovinos de los corra les comunes y del corral hospital, encontrando solo unos pocos positivos a Salmonella (el mismo serotipo que el del alimento) en un corral de 1 feedlot y ningún positivo en el hospital. Esta prestó credibilidad a que, diagnóstico de la Salmonellosis hospitalaria como un síndrome específico del feedlot siendo la desinfección del equipo de tratamiento, uno de los puntos críticos de control. Ya que otros feedlots no practicaban la desinfección rutinaria del equipo, se concluyo que otros (desconocidos) puntos críticos de control podrían estar envueltos en el establecimiento inicial de una sepa única de Salmonella en el corral de hospital.

Reference : 1. Cannon, RM and ROE, RT, Livestock Disease Surveys : A Ffield Manual for Veterinarians. Australians Bureau of Animal Health, Departament of Primary Industry. Australian Government Publishing Service, Canberra , 1982.

Appendix 1. Sample size required to detect attribute in a population or defined group with defined level of certainty.

Prevalence	1%	1%	1%	5%	5%	5%	10%	10%	10%	25%	25%	25%	50%	50%	50%	75%	75%	75%
Certainty	90%	95%	99%	90%	95%	99%	90%	95%	99%	90%	95%	99%	90%	95%	99%	90%	95%	99%
N = 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	7	8	3	4	5	2	3	4
20	20	20	20	19	20	20	14	16	18	7	9	11	4	5	6	2	3	4
30	30	30	30	24	26	29	16	19	23	8	9	13	4	5	7	2	3	4
40	40	40	40	28	31	36	17	21	27	8	10	14	4	5	7	2	3	4
50	50	50	50	30	35	42	18	22	29	8	10	14	4	5	7	2	3	4
60	59	60	60	32	38	47	19	23	31	8	10	15	4	5	7	2	3	4
70	68	70	70	34	40	51	19	24	33	8	10	15	4	5	7	2	3	4
80	76	79	80	35	42	54	20	24	34	8	10	15	4	5	7	2	3	4
90	84	87	90	36	43	57	20	25	35	8	10	15	4	5	7	2	3	4
100	91	96	100	37	45	59	20	25	36	8	10	15	4	5	7	2	3	4
125	106	114	122	38	47	64	21	26	37	8	11	16	4	5	7	2	3	4
150	118	130	143	39	49	68	21	26	38	8	11	16	4	5	7	2	3	4
175	128	144	163	40	50	71	21	27	39	8	11	16	4	5	7	2	3	4
200	137	155	180	41	51	73	21	27	40	8	11	16	4	5	7	2	3	4
225	144	166	196	41	52	74	21	27	40	8	11	16	4	5	7	2	3	4
250	151	175	210	42	53	76	21	27	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
275	156	182	223	42	53	77	22	28	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
300	161	189	235	42	54	78	22	28	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
400	175	211	273	43	55	81	22	28	42	8	11	16	4	5	7	2	3	4
500	184	225	300	43	56	83	22	28	42	8	11	16	4	5	7	2	3	4
600	191	235	321	44	56	84	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
700	196	243	336	44	57	85	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
800	200	249	349	44	57	85	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
900	203	254	359	44	57	86	22	29	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
1000	205	258	368	44	57	86	22	29	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
Infinite	229	298	458	45	59	90	22	29	44	9	11	17	4	5	7	2	3	4

Prevalence = lowest prevalence in group or population of interest detectable at defined certainty level using sample size given. Certainy = level of certainty of detection desired (90%, 95%, 99%). N = number of individuals in group or population of interest, Computations based on: Cannon RM and Roe RT, Livestock Disease Surveys: A Field Manual Veterinarians. Australian Bureau of Animal Health, Department of Primary Industry. Australian Government Publishing Service, Canberra, 1982.

Appendix 2a. Sample size required to place 90% confidence bound of desired witdh on an estimated proportion.

Est. prop.	5%	10%	10%	25%	25%	25%	25%	50%	50%	50%	50%	50%
Bound.	3%	3%	5%	3%	5%	10%	15%	3%	5%	10%	15%	20%
N = 30	25	27	23	29	27	19	13	29	27	21	15	11
40	32	35	29	38	34	23	15	38	35	26	18	12
50	37	43	33	46	41	26	16	47	43	29	19	13
60	43	50	38	55	47	28	17	56	50	32	20	14
70	47	56	41	63	52	30	17	65	56	35	21	14
80	52	62	44	71	58	31	18	73	62	37	22	14
90	56	68	47	78	63	33	18	81	68	39	23	15
100	59	73	50	85	67	34	19	89	73	41	24	15
125	67	86	55	103	78	36	20	108	86	44	25	15
150	73	97	59	119	87	38	20	125	97	47	25	16
175	79	107	63	134	94	40	20	142	107	49	26	16
200	84	115	66	148	101	41	21	158	115	51	26	16
300	97	142	74	196	121	44	21	215	142	55	28	16
400	105	161	78	234	135	45	22	261	161	58	28	17
500	111	175	82	265	144	46	22	300	175	60	29	17
1000	125	212	89	360	168	49	22	428	212	64	30	17
Infinite	142	269	97	560	202	50	22	747	269	67	30	17

Appendix 2b. Sample size required to place 95% confidence bound of desired witdh on an estimated proportion.

Est. prop.	5%	10%	10%	25%	25%	25%	25%	50%	50%	50%	50%	50%
Bound.	3%	3%	5%	3%	5%	10%	15%	3%	5%	10%	15%	20%
N = 30	27	28	25	29	28	22	16	30	28	23	18	14
40	34	37	32	39	36	26	18	39	37	29	21	16
50	41	45	37	48	43	30	20	48	45	33	24	17
60	47	52	42	56	50	33	21	57	52	37	25	18
70	53	60	47	65	57	36	22	66	60	41	27	18
80	58	67	51	73	63	38	23	75	67	44	28	19
90	63	73	55	81	69	41	24	83	73	47	29	19
100	67	80	59	89	75	42	25	92	80	49	30	20
125	78	95	66	109	88	46	26	112	95	55	32	21
150	87	108	72	127	99	49	27	132	108	59	34	21
175	94	121	78	144	109	52	28	151	121	63	35	22
200	101	132	82	161	119	53	28	169	132	65	36	22
300	121	169	95	219	147	59	29	235	169	73	38	23
400	135	196	103	267	168	62	30	291	196	78	39	23
500	145	218	109	308	183	63	31	341	218	81	40	23
1000	169	278	122	445	224	68	32	517	278	88	41	24
Infinite	203	384	138	800	288	72	32	1067	384	96	43	24

Est. prop. = crude estimate of proportion (use 50% if no information since this will give maximum sample size). Bound = distance either side of estimated proportion that confidence interval extends. N = number of individuals in population or group of interest.

Appendix 3a. Sample size required to place 90% confidence bound of desired witdh on an estimated mean.

Bound in Std. Dev. Units	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
N = 30	27	21	15	11	8	6	5	4	3	3
40	35	26	18	12	9	7	5	4	4	3
50	43	29	19	13	9	7	5	4	4	3
60	50	32	20	14	10	7	6	4	4	3
70	56	35	21	14	10	7	6	4	4	3
80	62	37	22	14	10	7	6	4	4	3
90	68	39	23	15	10	7	6	5	4	3
100	73	41	24	15	10	7	6	5	4	3
125	86	44	25	15	10	8	6	5	4	3
150	97	47	25	16	11	8	6	5	4	3
175	107	49	26	16	11	8	6	5	4	3
200	115	51	26	16	11	8	6	5	4	3
300	142	55	28	16	11	8	6	5	4	3
400	161	58	28	17	11	8	6	5	4	3
500	175	60	29	17	11	8	6	5	4	3
1000	212	64	30	17	11	8	6	5	4	3
Infinite	269	67	30	17	11	8	6	5	4	3

Appendix 3b. Sample size required to place 95% confidence bound of desired witdh on an estimated mean.

Bound in Std. Dev. Units	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
N = 30	28	23	18	14	11	8	7	6	5	4
40	37	29	21	16	12	9	7	6	5	4
50	45	33	24	17	12	9	7	6	5	4
60	52	37	25	18	13	10	7	6	5	4
70	60	41	27	18	13	10	8	6	5	4
80	67	44	28	19	13	10	8	6	5	4
90	73	47	29	19	14	10	8	6	5	4
100	80	49	30	20	14	10	8	6	5	4
125	95	55	32	21	14	10	8	6	5	4
150	108	59	34	21	14	10	8	6	5	4
175	121	63	35	22	15	11	8	6	5	4
200	132	65	36	22	15	11	8	6	5	4
300	169	73	38	23	15	11	8	6	5	4
400	196	78	39	23	15	11	8	6	5	4
500	218	81	40	23	15	11	8	6	5	4
1000	278	88	41	24	16	11	8	6	5	4
Infinite	384	96	43	24	16	11	8	6	5	4

Desired bound in Std. Dev. Units = Fraction of standar deviation that the desired bound represents. For example, if the SD is 10 and the desired bound is +/- 3 then the desired bound in standard deviation units is 3/10 = .3. N = number of individuals in population or group of interest