

PID 9058

***Escherichia coli* O157:H7 Productor de toxina Shiga aisladas de muestras de agua relacionadas a Establecimientos pecuarios de engorde a corral**

Tanaro J.D.¹, Piaggio M.C.¹, Gasparovic A.M.¹, Badaracco V.A.¹, Tesouro R.¹, Kesselman D.², Indart N.S.¹, De Gracia L.¹, Procura F.¹, Vitón M.¹, Molina D.¹, Rivas M.³

AUTORES: 1. Facultad de Bromatología, UNER. 2. Servicio de Bioquímica, Hospital Centenario Gualeguaychú. 3. Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán"

CONTACTO:

Resumen

Recientemente han ocurrido brotes debido vegetales contaminados por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Estos productos frescos se contaminan a través del contacto directo de heces bovinas (abono), o indirectamente a través de irrigación con agua contaminada.

Este estudio tuvo como objetivo establecer la prevalencia de STEC O157:H7 en muestras de agua relacionadas a establecimientos pecuarios de engorde a corral (EPEC) de la provincia de Entre Ríos, Argentina, y su eventual relación con cepas vinculadas a enfermedad transmitida por alimentos. Usando como indicadores microbiológicos, coliformes, *Escherichia coli*, y anaerobios sulfito-reductores, se estudió la eficiencia en el saneamiento de los efluentes de un EPEC que contaba con un sistema de lagunas sanitarias.

Entre abril/2009 y julio/2011 se estudiaron 320 muestras de agua vinculadas a efluentes de 11 EPEC. Las cepas fueron caracterizadas feno-genotípicamente y subtipificadas por macrorrestricción y electroforesis de campo pulsado. Algunos de los perfiles identificados están incluidos en la base de datos nacional, correspondiendo a cepas obtenidas de casos de Síndrome Urémico Hemolítico, diarrea, muestras alimenticias y de origen animal. Los EPEC deben implementar estrategias de control con objeto de limitar el ingreso de STEC en el medioambiente acuático. En el sistema de lagunas sanitarias estudiado se constató una franca disminución de los indicadores utilizados pero insuficiente para eliminar su aporte al ambiente. La optimización de su funcionamiento es función de su mantenimiento, en especial la frecuente remoción de barros de las primeras piletas.

Palabras clave: Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), *E. coli* O157, agua, feedlot

1. Introducción

1.1. Relevancia del Síndrome Urémico Hemolítico post-entérico

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) post-entérico es una enfermedad que tomó publicidad en el brote ocurrido en EEUU en 1982, a partir de hamburguesas elaboradas por una cadena de comidas rápidas. En ese momento se identificó un serotipo de *Escherichia coli*, el O157:H7, como un agente patógeno emergente. Posteriormente se observó que la enfermedad podía ser causada por un grupo de más de 100 serotipos poseedores de ciertas adhesinas y de la capacidad de producir toxina Shiga, una citotoxina que tiene como blanco células del endotelio vascular. Ese grupo se denominó de varias maneras: STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*), VTEC (Verocytotoxin-producing *E. coli*), y EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*). Dentro de ellos pudieron identificarse seis serogrupos ("the big Six" non-O157 STECs) frecuentemente asociados a enfermedad severa: O26, O45, O103, O111, O121, O145. Esta enfermedad, caracterizada por colitis hemorrágica, anemia hemolítica y fallo renal, tiene actualmente una distribución mundial afectando a países con elevados estándares sanitarios. Recientes brotes, como el ocurrido en 2011 en Alemania, ponen en evidencia la complejidad de esta enfermedad transmitida por alimentos (ETA) respecto a los vehículos y a los agentes etiológicos. En este brote, que registró más de 4000 enfermos, 50 muertos y afectó a mayores de 18 años, el agente fue un *E. coli* enteroagregativo (EAEC), un tipo diarreogénico distinto, que había adquirido la capacidad de producir la citotoxina, vehiculizado por vegetales.

El SUH afecta especialmente a chicos entre los 9 meses y los 5 años, pero los adultos no están exentos de padecerlo. En ancianos puede desarrollarse una afección, que además de la tríada característica del SUH, cursa con síntomas neurológicos y alcanza una tasa de letalidad del 50 % (USDA, 1992): la Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT).

1.2. Relevancia del problema sanitario en Argentina

En Argentina, país con alto consumo de carne per cápita (52 kg por persona por año), el SUH es una antropozoonosis endémica con alta incidencia (12 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años en el año 2009). Se diagnostican más de 400 nuevos casos cada año, significando en relación a su población, unas 11 veces más casos en niños que en otros países que padecen también esta enfermedad. En Entre Ríos se registran una decena de casos anuales.

Si bien un 60% de los enfermos se recupera sin secuelas y un 30% permanece con secuelas menores, el 5% evoluciona hacia una insuficiencia renal crónica, y en la etapa aguda, la mortalidad es del 2 al 5%. El SUH es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes.

1.3. Impacto económico de la enfermedad

Los costos del tratamiento del síndrome urémico hemolítico (SUH) en sus distintas etapas evolutivas, fueron evaluados en aproximadamente 2 millones de dólares anuales (Calletti y col., 2006). Pero además de los efectos propios de cualquier enfermedad, inherentes a atención profesional, hospitalizaciones, medicamentos y pérdidas de productividad, esta enfermedad puede producir perjuicios comerciales.

Existe una creciente demanda de estándares integrales de calidad por parte de los distintos mercados mundiales donde habitualmente se comercializan productos alimenticios argentinos.

Los organismos internacionales que regulan la inocuidad alimentaria, como la European Food Safety Authority (EFSA, 2007) y el United States Department of Agriculture (USDA) (Eblen, 2008) han puesto atención en la contaminación con STEC O157 y otros serogrupos patogénicos afines.

1.4. Características de los agentes etiológicos

Factores de virulencia

Las toxinas Shiga (Stx) son el principal factor de virulencia de STEC (Calderwood, 1996). La mayoría de las cepas de STEC poseen un plásmido de 90 Kb que contiene diversos genes que codifican para una serina proteasa extracelular (*espP*), una catalasa-peroxidasa (*katP*), una enterohemolisina (***exhA***), el sistema de secreción tipo II (*etp*) y una fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos (Schmidt, 2000). En la región LEE (locus of enterocyte effacement) del cromosoma se encuentra el gen *eae*, que codifica una proteína (intimina) responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (**attaching and effacing**). La región LEE codifica además otros genes ligados a la virulencia. Se ha descrito además también otro grupo de adhesinas relacionadas con la adherencia de las cepas STEC al enterocito.

Reservorio

El análisis epidemiológico de los brotes por STEC O157 señala al ganado vacuno como el mayor reservorio para esos patógenos (Karmali, 1989).

Particularidades que agravan el problema

- baja dosis infectiva: menos de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (Paton and Paton, 1998).

- resistencia a acidez: sobrevive en mayonesa (pH 3,6 a 3,9) durante 5 a 7 semanas a 5 °C y en jugo de manzana (pH 3,6 a 4,0) durante 10 a 31 días a 8 °C. También sobrevive a la fermentación, a la desecación y al almacenamiento de los embutidos fermentados (3 meses a 5 °C).

- vehículos: por su peculiar baja dosis infectiva además de transmitirse por alimentos y agua contaminada, también puede hacerlo por contacto. La vía más probable para los lactantes podría ser el contacto persona-persona. También el contacto con animales portadores (mascotas y animales de granja).

Entre los alimentos involucrados en brotes se cuentan carne picada insuficientemente cocida, leche cruda, jugos envasados sin pasteurizar, frutas y verduras que puedan haber sido regadas con agua no potable. Importantes brotes han sido vehiculizados por vegetales (lechuga, espinaca, brotes de semillas germinadas).

1.5. Prevención

Las estrategias de prevención de la infección humana con esta bacteria apuntaron en un principio a eliminarla por procedimientos térmicos estableciendo temperaturas mínimas de cocción de hamburguesas, obligatoriedad de pasteurizar jugos de fruta, etc. Posteriormente, para minimizar el ingreso de los STEC en la cadena alimentaria, en algunos países se están realizando ingentes esfuerzos por reducir la prevalencia de STEC previo a la faena (En EEUU: National Program 108 Food Safety 2006-2010 Action Plan for "Pathogen Reduction Preharvest"), para lo cual muchos estudios se han abocado a comprender mejor la ecología de esta bacteria (Beutin, 2006).

Las estrategias de control consideran distintos niveles en los que se pueden aplicar medidas: el animal individual, el establecimiento pecuario y el área rural de producción (LeJeune, 2012).

1.6. Ecología de *Escherichia coli*

Como consecuencia de la excreción fecal de STEC por animales, el grado de contaminación ambiental con estas bacterias es importante. Los estudios han mostrado que STEC O157 puede permanecer como bacteria viable en las heces animales más de 20 meses, y la contaminación del suelo con efluentes de

la agricultura, frigoríficos y aguas residuales es importante particularmente en áreas con **alta densidad de ganado** y otros animales domésticos (Maule A., 2000).

1.7. Factores socio-económicos

La alimentación intensiva de bovinos a corral o **engorde en confinamiento** (feedlot) ha crecido de hecho en todo el país impulsada por factores económicos y políticos (ampliación de la frontera agrícola, control de precios, etc.).

La experiencia de otros países demuestra que esta actividad, realizada en forma desordenada, puede provocar una alta contaminación ambiental, debido a que la materia fecal bovina contiene patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, el hecho de generarse grandes volúmenes de estiércol concentrados en estrechas áreas permite, si se implementan los recursos apropiados, aplicar sistemas de saneamiento que los eliminen y el aprovechamiento secundario de los residuos como biofertilizante, producción de biogás, etc. (Bolton y col., 2004; Botero, 2004; Stonehouse y col., 2008).

1.8. El agua como vehículo directo e indirecto de *E. coli* productor de toxina Shiga

El agua es una vía de transmisión en forma directa o indirecta al ser humano (Hrudey y col., 2003; Gerdreich y col., 1992; Swerdlow y col., 1992). Las aguas recreacionales son una vía documentada, donde la transmisión se atribuiría a la ingestión de pequeños volúmenes de agua (Brewster y col., 1994; Friedman y col., 1999; Bruce y col., 1999; Feldman y col., 2002; Keene y col., 1994; Paunio y col., 1999; Sampour y col., 2002). Tradicionalmente *E. coli* en agua se ha considerado un indicador de contaminación fecal reciente, suponiendo la difícil supervivencia en el ambiente extraintestinal (Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998). Sin embargo hoy se sabe que puede permanecer en fase estacionaria durante largos periodos de tiempo, para lo cual estarían implicados genes como el *rpoS*, que codifica para el factor sigma (Paton y col., 1998_a), y el medio acuático podría ser un reservorio importante (Lee Lang y col., 1994; Grant y col., 1996; Kurokawa y col., 1999).

El agua tiene importancia crítica en la colonización del ganado (Hancock y col., 2001; LeJeune y col., 1997; LeJeune y col., 2001). Se observó que los abrevaderos contienen *E. coli* O157:H7 (Faith y col., 1996; LeJeune y col., 2001), y que puede sobrevivir en los sedimentos por lo menos 4 meses.

1.9. El efluente de la cría intensiva

Los establecimientos de cría intensiva de bovinos a corral (o los EPEC) generan efluentes, que independientemente del número de animales que tenga el establecimiento, cada vez que hay lluvias suficientemente copiosas para que se produzcan escorrentías (agua corriendo superficialmente luego de superar la capacidad de absorción del terreno), la materia fecal alcanza, siguiendo el declive, los cursos de aguas abiertas más cercanos. De este modo el agua constituye un importante vehículo para su diseminación.

Entre Ríos es una provincia con una profusa red de cursos de agua y no es, en consecuencia, el escenario ideal para este tipo de explotación (Badaracco V., 2008). Son necesarios estudios científicos que propongan estrategias adaptadas al contexto particular para mitigar el impacto ambiental generado por esta actividad productiva. En la Figura 1 se observa la distribución geográfica de los EPEC (círculos negros) existentes durante el lapso del desarrollo del proyecto. En ella se puede apreciar que los establecimientos están más concentrados en ciertas zonas, lo cual implica una mayor presión sobre ciertas cuencas hídricas en particular. En muchos casos, se encuentran situados a distancias menores a 1.000 m (círculos rojos), distancia mínima que establece en su artículo 9º la normativa provincial (Res. Nº 6491/06-SPG Expte. Nº 734213); y que la nutrida red hidrográfica hace imposible que estén distantes de cursos de agua.

2. Hipótesis

E. coli O157:H7/NM (y otros patógenos) contenidos en los efluentes de los EPEC son malos competidores con la flora saprófita y pueden eliminarse a través del uso de lagunas de estabilización (“lagunas sanitarias”).

3. Objetivos

Objetivos generales

- Proveer información para que el engorde intensivo de bovinos a corral sea una actividad sustentable.
- Colaborar en estrategias de prevención de la infección humana con esta bacteria

Objetivos particulares

- Caracterizar cepas STEC O157:H7/NM en muestras de aguas superficiales relacionadas a efluentes de feedlots en la provincia de Entre Ríos.
- Correlacionar las cepas STEC O157:H7/NM aisladas con cepas clínicas y de alimentos (Base Nacional de *E. coli* O157, Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”).
- Determinar algunos indicadores microbiológicos (Coliformes totales, *E. coli* y Anaerobios sulfito-reductores) como marcadores o monitores de la eficiencia de un sistema de depuración de los efluentes de un EPEC.
- Determinar indicadores químicos (nitratos y fosfatos).
- Generar información para el ordenamiento territorial de los feedlots.

4. Materiales y métodos

4.1. Área de muestreo, período de toma de muestras y tipos:

Se efectuó un relevamiento de los establecimientos considerando su categoría, según la normativa provincial citada (Tabla 1) y su distribución geográfica (Figura 1), previo a la toma de muestras.

Se recogieron 360 muestras en el lapso de un año (desde septiembre/2009 hasta, septiembre/2010), considerándose tres tipos de muestras: las provenientes de charcos internos de los corrales o conectados lateralmente (C₁, n=161), las de lagunas que recibían las eventuales escorrentías de los corrales (C₂, n=153), y las de lagunas próximas ubicadas en contrapendiente y cursos con flujo de agua no expuestos al efluente del feedlot (C₃, n=46).

Se escogió un establecimiento en particular para constatar la eficiencia de un sistema de lagunas sanitarias, el cual albergaba unos 7.000 animales y contaba con 2 pares de piletas de sedimentación primaria, 2 pares subsiguientes de sedimentación secundaria, y una quinta pileta final, desde donde se liberaba el agua. Todas las piletas tenían una profundidad aproximada de 4 m y estaban en proceso anaeróbico.

4.2. Metodología de las determinaciones microbiológicas

4.2.1. Pruebas preliminares de ajuste de la metodología para recuperar el patógeno estudiado

Las muestras de agua se recogieron en envases plásticos estériles con tapa a rosca con un volumen aproximado de 1500 a 2000 ml. Inmediatamente de obtenida la muestra, se le medía el pH y se registraba la temperatura a la que se encontraba. Luego se separaba un volumen de 100 ml en frascos de vidrio y se acidificaba para realizar las determinaciones químicas (nitratos y fosfatos).

Las técnicas cotejadas consistieron en:

1. Sembrar la muestra en caldos doble concentración.

2. Filtrar la muestra con hisopos de Spira (rollo de gasa estéril inserto en un cilindro a través del cual se hace pasar la muestra).

3. Introducir hisopos de Moore en botellas estériles conteniendo 1500 ml de muestra y exponerlos durante 16 a 18 h a temperatura ambiente.

Se optó por la tercera técnica que resultó notablemente más práctica y rendidora

- Se comparó el rendimiento de tres medios de aislamiento (dos cromogénicos: ID O157 bioMeriéux (ID) y CHromagar O157 (CHROM) y Agar sorbitol MacConkey (SMAC).

Ninguno de los tres medios fue suficientemente selectivo como para impedir el desarrollo invasivo de *Pseudomonas* spp, cuando se encontraba en alto número en las muestras. Los tres medios exhibieron colonias falsamente presuntivas (color y aspecto), siendo esto más notable en el caso de SMAC. Además, en este último medio, la lectura debía realizarse sin demora y sólo en las estrías donde las colonias estuviesen suficientemente aisladas entre sí. Se probó añadirle como inhibidores telurito de potasio (2,5 mg/l) y cefixima (0,05 mg/l), pero se desestimó por no obtenerse una apreciable diferencia en la recuperación. Para aumentar la probabilidad de recuperación se decidió utilizar en forma paralela los tres medios.

- Se realizó una experiencia de adaptación y resistencia a la acidez.

Esta prueba se efectuó con cuatro cepas de *E. coli* O157:H7 obtenidas en los ensayos preliminares con muestras reales. Para disponer de bacterias ácido-adaptadas (A) y no adaptadas (NA), las células en fase estacionaria de cada cepa se inocularon en 0,1 ml de caldo soja tripticosa con 1% de glucosa y sin glucosa, respectivamente, y se incubaron por 18 hs a 37 °C. Después de la incubación, un volumen de 0,1 ml de cultivo de 18 hs de cepas A y NA, se sembraron en dos series de tubos con TSB a pH 2,5 3,5 4,0 y 4,5 acidificadas con HCL concentrado y con un ácido orgánico (ácido acético), respectivamente. Inmediatamente después de la inoculación y posteriormente a las 6 hs se estriaron una ansada de cada caldo en placas de TSA y SMAC.

Las conclusiones del ensayo se presentan en la Tabla 2 y se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Las cuatro cepas ensayadas resistieron y recuperaron viabilidad en ambos medios hasta pH 2,5 en CLH

2. Con el ácido orgánico (Ác. acético) dos de las cepas persistieron viables hasta pH 4,0 (una de ellas sólo en TSA), y dos hasta pH 4,5.

El resultado de este ensayo fundamentó el empleo del choque ácido descrito en el ítem siguiente.

4.2.2. Metodología adoptada para STEC O157:H7/NM

Consistió en obtener un volumen de 1500 ml de muestra en recipientes plásticos estériles con tapa a rosca, a los cuales se les introdujo un hisopo de Moore con el objeto de ponerlo en contacto durante 16 a 18 h. En aquellos casos en que la muestra exhibía demasiada consistencia por la abundancia de sólidos en suspensión, se diluía con agua destilada estéril. Posteriormente se retiraron asépticamente los hisopos y se colocaron en 100 ml de caldo tripticosa soja (TSB) (BIOKAR®) durante 5 h a temperatura ambiente con el objeto de resucitar células estresadas. Luego se realizó el choque ácido consistente en añadir ácido clorhídrico concentrado gota a gota agitando constantemente hasta ajustar a pH 4,0 y se dejó en reposo 30 minutos. A continuación el caldo se neutralizó (pH 7.0) con el agregado de 100 ml de caldo Tris-TSB con sales biliares 1,12 g/L, y se incubó a 42 °C durante 18-24 h. Seguidamente a 1 ml de este caldo se le practicó inmunocentración magnética (IMS) (DYNAL®), y 30 µl del concentrado se estriaron en sendas placas de agar MacConkey Sorbitol (SMAC) (BIOKAR), ID O157 Medium™ (ID) (BIOMERIEUX) y Chromagar O157 (CHROM) (CHROMAGAR), incubándolas a 35-37 °C durante 18-24 h. Las colonias presuntivas se grillaron en SMAC (10 de cada medio) y se incubaron a 35-37 °C durante 18-24 h. Luego se realizaron extractos con Tritón 1X tomando una ansada de la confluencia de una de las tres placas correspondientes a cada muestra, y extractos de "pools" de cada 10 colonias repicadas en el gri-

llado. A cada uno de estos extractos se le practicó a manera de tamizaje una PCR múltiple (genes *rfb*_{O157}, *stx*₁ y *stx*₂). A los “pools” que acusaron positividad se los dividió y se repitió el procedimiento hasta lograr el aislamiento de colonias que se caracterizaron mediante una galería de pruebas bioquímicas (API 20 E bioMérieux). Luego se realizó en el Servicio Fisiopatogenia, Dpto. de Bacteriología, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina la caracterización genética. Esta caracterización consistió en la detección por reacción en cadena de polimerasa (PCR), los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}, *eae*, *ehxA*, *saa*, *fliC*_{H7} y mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), las variantes de Stx. La técnica de PFGE (Electroforesis de campos pulsados) fue realizada según el protocolo estandarizado de la red PulseNet [PulseNet standardised PFGE protocol for *E. coli* O157:H7 (CDC, 2004)].

4.2.3. Metodología para indicadores microbiológicos

Se determinaron coliformes totales y *Escherichia coli* por recuento en placa en agar bilis con cristal violeta y rojo neutro (agar VRBL Biokar Diagnostics) y ChromID™ Coli BioMérieux, respectivamente. La siembra se hizo en superficie con 100 µl de diluciones decimales en placas por duplicado, incubándose a 37 °C por 24 h. Se cuantificaron anaerobios sulfito-reductores por recuento en tubos con agar tripton sulfito neomicina (TSN agar Biokar). La siembra en profundidad se realizó con 1 ml de diluciones decimales por duplicado, incubándose a 37 °C por 24 h.

4. 3. Metodología de las determinaciones químicas

4.3.1. Determinación de nitratos

Se realizó por el método colorimétrico según Standard Methods, según el cual el anión NO₃⁻¹ reacciona con el alcaloide brucina en medio ácido fuerte (H₂SO₄), oxidándolo y originando cacotelina, de color rojo inestable que cambia rápidamente a un color amarillo que sirve de base para su cuantificación.

4.3.2. Determinación de fósforo

Se realizó por el método colorimétrico según Standard Methods, basado en la reacción del fósforo, presente en la muestra, con molibdato de amonio para producir el complejo de color azul de fosfomolibdato; como agente reductor se utilizó el ácido ascórbico.

En la Figura 2 se representa como diagrama de flujo el procesamiento que se adoptó.

5. Resultados

5.1. Frecuencia de detección y aislamiento de STEC O157:H7/NM según el tipo de muestras estudiadas

En Charcos internos de los corrales o conectados lateralmente se detectó la presencia del gen *rfb*_{O157} en el 75,0% de las muestras estudiadas y se logró aislar *E. coli* O157 en un 36,0% de ellas, habiendo resultado el 13,0% cepas toxigénicas. En lagunas que reciben las escorrentías de los corrales (cuando las precipitaciones superan la capacidad de absorción del suelo) se detectó la presencia del gen *rfb*_{O157} en el 65,0% de las muestras estudiadas y se logró aislar *E. coli* O157 en un 39,0% de ellas, siendo un 13,0% cepas toxigénicas. En lagunas próximas ubicadas en contrapendiente y cursos con flujo de agua no expuesto al efluente del feedlot se detectó la presencia del gen *rfb*_{O157} en el 55,0% de las muestras estudiadas, y se logró aislar *E. coli* O157 en un 17,0% de ellas, siendo un 5,0% cepas toxigénicas. (Tabla 3).

5.2. Genotipificación de las cepas obtenidas

El genotipo más prevalente hallado fue *stx*₂/*stx*_{2c(vh-a)} (50%) seguido por *stx*₂ (47.4%). Todas las cepas STEC eran portadoras de los genes *eae*, *ehxA*, y *fliC*_{H7}. Por análisis de los fragmentos de restricción

utilizando la enzima XbaI y electroforesis de campo eléctrico pulsado (XbaI-PFGE) se estableció la relación clonal de 38 STEC O157. El análisis (Fig. 3) mostró 16 diferentes patrones con 83,9 % de similitud, con 29 cepas agrupadas en 7 clusters (I-VII) integradas de 2 a 10 cepas cada uno indistinguibles entre sí (100 % de homología). En 9 cepas se observó un patrón independiente (Figura 4 y Tabla 3).

5.3. Indicadores microbiológicos de la eficiencia en el saneamiento del sistema de lagunas sanitarias estudiado

Los valores de Coliformes totales, *Escherichia coli* y Anaerobios sulfito-reductores correspondientes al efluente sin tratamiento, fueron respectivamente: $10^{7,64}$ UFC/100 ml, $10^{7,26}$ UFC/100 ml y $10^{4,48}$ UFC/100 ml. Para las lagunas primarias y secundarias del sistema fueron respectivamente: $10^{5,44}$ UFC/100 ml, $10^{5,18}$ UFC/100 ml y $10^{4,15}$ UFC/100 ml. Para la laguna final y salida del sistema fueron respectivamente: $10^{5,00}$ UFC/100 ml, $10^{4,60}$ UFC/100 ml y $10^{3,78}$ UFC/100 ml (Figura 4).

En cursos de agua próximos al establecimiento estudiado pero no expuestos a sus efluentes, los valores de Coliformes totales, *Escherichia coli* y Anaerobios sulfito-reductores, correspondientes al efluente sin tratamiento fueron respectivamente: $10^{3,15}$ UFC/100 ml, $10^{3,00}$ UFC/100 ml y $10^{2,30}$ UFC/100 ml (Tabla 5).

5.4. Determinaciones químicas

Los valores obtenidos tuvieron una notable fluctuación, por lo cual se optó por expresar sus medianas. Los nitratos y el fósforo en los efluentes sin tratamiento resultaron 2,42 mg/l y 23,1 mg/l respectivamente. En las lagunas colectoras de los efluentes los valores disminuyeron a 0,65 mg/l para los nitratos y de 11,7 mg/l para el fósforo.

Los cursos de agua cercanos a los feedlots no expuestos a sus efluentes tuvieron una mediana de 1,40 mg/l para los nitratos y de 1,50 mg/l para el fósforo.

6. Discusión

Los EPEC que registraron mayor contaminación con STEC O157 no estaban confinados en un departamento determinado, sino más bien dispersos en la provincia. El mayor aislamiento de cepas toxigénicas se observó en un EPEC del norte de la misma.

No se observó una diferencia significativa en la frecuencia de aislamiento en los charcos internos de los corrales o conectados lateralmente (C1) y las lagunas que reciben las escorrentías de los corrales cuando las precipitaciones superan la capacidad de absorción del suelo (C2). En las lagunas próximas ubicadas en contrapendiente y arroyos (C3) la frecuencia fue significativamente menor, pero igualmente se constata contaminación con STEC O157.

Los genes marcadores de *E. coli* O157 tuvieron una alta presencia en los tres tipos de muestra, constatándose en el 75 % de las muestras correspondientes a los charcos internos o inmediatos al feedlot, en el 65 % en las lagunas que reciben las escorrentías y en un 55 % de las lagunas ubicadas en contrapendiente y arroyos. Los porcentajes de recuperación de cepas de las muestras positivas al tamizaje por PCR (definidos como: Frecuencia de aislamiento de cepas *E. Coli* O157/frecuencia de detección del gen *rfb*_{O157}) fueron 48,5 %, 60,0 % y 30,3 %. Aunque en menor frecuencia, la presencia del patógeno marcador en aguas próximas no expuestas al efluente del feedlot, indica otras fuentes de contaminación diferentes de las escorrentías. Hay que tener en cuenta los vectores, especialmente las aves, que en grandes bandadas acuden a los corrales buscando los granos sin digerir en la bosta de estos animales sobre-alimentados. La elevada frecuencia con que se verifica la presencia de los genes marcadores de *E. coli* O157 y la menor recuperación de cepas en cultivo indicaría, por un lado, que el patógeno marcador está muy extendido, y por el otro, que hay células que permanecen en estado

estacionario de difícil crecimiento, o bien que la numerosa flora asociada dificulta su recuperación. Aporta más a la primera posibilidad el hecho de que no se puedan recuperar las cepas en el 70% de las muestras PCR+ de las aguas próximas no expuestas al efluente del feedlot, contra un 50% de recuperación en los charcos internos de los corrales (con densa flora microbiana asociada pero expuestos recientemente a la materia fecal bovina).

Respecto a la **eficiencia de saneamiento del sistema de lagunas sanitarias estudiado**, se observa que la línea de tendencia del recuento de **coliformes totales** mostró una caída cercana a tres logaritmos (de $10^{7.64}$ a 10^5) luego de que el efluente "crudo" pasa por el proceso de las lagunas sanitarias. De todas maneras, aporta un alto contenido bacteriano al que poseen naturalmente ($10^{3.15}$) los cursos de agua. La línea de tendencia para ***Escherichia coli*** también evidenció una caída paralela significativa similar (de $10^{7.26}$ a $10^{4.6}$). Se observa una brusca disminución del recuento de *E. coli* al encontrarse con la flora anaerobia de las primeras piletas, manteniéndose luego sin cambio significativo al pasar a la pileta final. Asimismo se constató que la concentración de *E. coli* presente en las aguas abiertas no afectada por el feedlot fue mucho menor (10^3).

La línea de tendencia de **Anaerobios Sulfito-Reductores** mostró una caída leve de menos de un logaritmo (de $10^{4.48}$ a $10^{3.78}$), la que permaneció casi sin variación entre las primeras piletas y el efluente del sistema. También se observó que en aguas no expuestas a los efluentes de feedlot, la concentración de anaerobios naturalmente presente fue bastante menor ($10^{2.3}$).

En relación a la tipificación molecular de las cepas obtenidas, algunos de los perfiles *Xba*I-PFGE identificados, están incluidos en la base de datos nacional, correspondiendo a cepas obtenidas de casos de Síndrome Urémico Hemolítico, diarrea, muestras alimenticias, y de origen animal. Entre ellos, el patrón AREHX01.0022 es el segundo prevalente en Argentina, representando el 5.5% del total.

Los valores obtenidos en las determinaciones realizadas en las muestras exhibieron una amplia variación, destacándose el importante aporte de fósforo. El desbalance P/N típico de este tipo de efluentes (Pordomingo, 2003), en suelos deficientes en P como los de la Provincia de Entre Ríos, podría considerarse positivo, sin embargo el volcado masivo de este efluente conduce a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos.

7. Conclusiones

Los EPEC deben implementar estrategias de control con objeto de limitar el ingreso de STEC en el ambiente acuático. *E. coli* O157 no es un microorganismo altamente competitivo y las lagunas sanitarias serían útiles para minimizar su diseminación, sin embargo es necesario estudiar otras vías de propagación, por ejemplo, la relevancia de vectores potenciales (la fauna silvestre, los insectos) en la persistencia de la bacteria en los rodeos.

Los efluentes utilizados para regadío deben tratarse previamente para liberarlos de los patógenos potenciales. En estudios realizados previamente por este equipo de investigación hemos verificado la presencia del patógeno marcador en un arroyo aguas debajo de un establecimiento de cría intensiva, y aún en zonas recreacionales del Río Gualeguaychú (Tanaro *et al.*, 2002 y 2010). El mismo criterio debe aplicarse para la utilización de los residuos sólidos como abono en quintas de hortalizas y otras.

Los estudios de impacto son imprescindibles para un buen ordenamiento territorial de los establecimientos de cría intensiva (habilitación). Resulta imperativo la implementación de una normativa ordenadora de protección al ambiente, sino los establecimientos de cría intensiva se seguirán estableciendo con criterios puramente empresariales.

TABLA 1. Distribución geográfica de los EPEC existentes durante el lapso del proyecto y su clasificación por categorías

Departamento	Población (miles)	Superficie (Km ²)	Densidad (Hab/Km ²)	Feedlots (n)	Categoría			
					1 °c	2 °c	3 °c	4 °c
Paraná	276	4.974	55,5	30	23	5	2	
La Paz	62	6500	9,5	22	19	1	1	1
Gualedguaychú	90	7086	12,7	14	10	3		1
Villaguay	43	6654	6,5	14	10	3	1	
Gualedguay	43	7178	6,0	12	3	5	2	2
Diamante	40	2774	14,4	12	6	6		
Nogoyá	37	4282	8,6	6	3	2	1	
Victoria	30	6822	4,4	5	5			
Federal	22	5060	4,3	5	4	1		
Rosario del Tala	24	2663	9,0	5	3	2		
Federación	49	3760	13,0	4-5	3	1		
Uruguay	86	5855	14,7	3-6		2	1	
Feliciano	12	3143	3,8	3	1	2		
Islas del Ibicuy	11	4500	2,4	2		2		
Colón	45	2893	15,6	2-4	1			1
San Salvador	14	1280	10,9	1-2	1			
Concordia	136	3357	40,5	0				
Totales	1020	78781	12,9	140	92	35	8	5

REFERENCIAS

1c: establecimientos con capacidad de engorde de igual o menos de 500 unidades EPEC

2c: establecimientos con capacidad de engorde de 501 a 1.500 unidades EPEC

3c: establecimientos con capacidad de engorde de 1.501 a 2.500 unidades

4c: establecimientos con capacidad de engorde mayor a 2.501 unidades EPEC

Según Res. Nro. 6491/06-SPG Expte. N° 734213 de la Pcia. de Entre Ríos

TABLA 2. Adaptación y resistencia a la acidez de cuatro cepas de *E. coli* O157:H7

Nº	Cepa	Stress ác.	pH	A/NA	TSA	SMAC
1	H8	CIH	2,5	A	+	+
2	H8	CIH	2,5	NA	+	+
3	H8	CIH	3,5	A	+	+
4	H8	CIH	3,5	NA	+	+
5	H8	CIH	4,0	A	+	+
6	H8	CIH	4,0	NA	+	+
7	H8	CIH	4,5	A	+	+
8	H8	CIH	4,5	NA	+	+
9	H8	Acético	3,5	A	-	-
	H8	Acético	3,5	A	NSR	NSR
10	H8	Acético	4,0	A	+	+
	H8	Acético	4,0	A	NSR	NSR

La tabla continúa en página siguiente >>>

11	H8	Acético	4,5	A	+	-
	H8	Acético	4,5	NA	NSR	NSR
12	H5	CIH	2,5	A	+	+
13	H5	CIH	2,5	NA	+	+
14	H5	CIH	3,5	A	+	+
15	H5	CIH	3,5	NA	+	+
16	H5	CIH	4,0	A	+	+
17	H5	CIH	4,0	NA	+	+
18	H5	CIH	4,5	A	+	+
19	H5	CIH	4,5	NA	+	+
20	H5	Acético	3,5	A	-	-
21	H5	Acético	3,5	NA	-	-
22	H5	Acético	4,0	A	+	-
23	H5	Acético	4,0	NA	-	-
24	H5	Acético	4,5	A	+	-
25	H5	Acético	4,5	NA	+	+
26	F8	CIH	2,5	A	+	+
27	F8	CIH	2,5	NA	+	+
28	F8	CIH	3,5	A	+	+
29	F8	CIH	3,5	NA	+	+
30	F8	CIH	4,0	A	+	+
31	F8	CIH	4,0	NA	+	+
32	F8	CIH	4,5	A	+	+
33	F8	CIH	4,5	NA	+	+
34	F8	Acético	3,5	A	-	-
35	F8	Acético	3,5	NA	-	-
36	F8	Acético	4,0	A	-	-
37	F8	Acético	4,0	NA	-	-
38	F8	Acético	4,5	A	+	+
39	F8	Acético	4,5	NA	+	+
40	H9	CIH	2,5	A	+	+
41	H9	CIH	2,5	NA	+	+
42	H9	CIH	3,5	A	+	+
43	H9	CIH	3,5	NA	+	+
44	H9	CIH	4,0	A	+	+
45	H9	CIH	4,0	NA	+	+
46	H9	CIH	4,5	A	+	+
47	H9	CIH	4,5	NA	+	+
48	H9	Acético	3,5	A	-	-
49	H9	Acético	3,5	NA	-	-
50	H9	Acético	4,0	A	-	-
51	H9	Acético	4,0	NA	-	-
52	H9	Acético	4,5	A	+	-
53	H9	Acético	4,5	NA	+	-

REFERENCIAS

(+): Desarrollo

(-): Sin desarrollo

NSR: No se realizó

A: Cepa adaptada a ácido

NA: Cepa no adaptada a ácido

TSA: agar soja tripticasa

SMAC: agar sorbitol Mac Conkey

TABLA 3. Frecuencia de detección y aislamiento según el tipo de muestras estudiadas

	PCR+ gen <i>rfb</i> _{O157}		Cepas EC O157		Cepas STEC O157	
	n	%	n	%	n	%
C1	97	75	47	36	17	13
C2	85	65	51	39	17	13
C3	33	55	10	17	3	5

Nº muestras totales: 360

C1: Charcos internos de los corrales o conectados lateralmente

C2: Lagunas que reciben las escorrentías de los corrales cuando las precipitaciones superan la capacidad de absorción del suelo

C3: Lagunas próximas ubicadas en contrapendiente y cursos con flujo de agua no expuesto al efluente del feedlot.

TABLA 4. Distribución de STEC O157 en clusters XbaI-PFGE

Cluster	Patrón XbaI-PFGE	Fecha	Origen	Genotipo
I	AREXHX01.0489	25/10/2010	Curso de agua próximo	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		25/10/2010	Efluente del feedlot	
		25/10/2010	Efluente del feedlot	
		25/10/2010	Laguna sanitaria	
		25/10/2010	Efluente del feedlot	
		25/10/2010	Laguna sanitaria	
		25/10/2010	Laguna sanitaria	
		25/10/2010	Laguna sanitaria	
		30/08/2010	Efluente del feedlot	
		24/11/2010	Efluente del feedlot	
	AREXHX01.0835	25/10/2010	Laguna sanitaria	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
	AREXHX01.0840	14/06/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
II	AREXHX01.0837	30/08/2010	Laguna sanitaria	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		30/08/2010	Laguna sanitaria	
		30/08/2010	Laguna sanitaria	
III	AREXHX01.0731	25/10/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		30/08/2010	Efluente del feedlot	
		30/08/2010	Curso de agua próximo	
	AREXHX01.0314	02/08/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
	AREXHX01.0838	12/04/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
IV	AREXHX01.0095	31/05/2010	Curso de agua próximo	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		31/05/2010	Curso de agua próximo	
	AREXHX01.0834	24/11/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
	AREXHX01.0505	20/07/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
	AREXHX01.0839	17/08/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
V	AREXHX01.0832	21/06/2011	Curso de agua próximo	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		04/07/2010	Efluente del feedlot	

La tabla continúa en página siguiente >>>

VI	AREXHX01.0022	25/10/2010	Laguna sanitaria	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>
		21/06/2011	Efluente del feedlot	
	AREXHX01.0022	04/07/2010	Laguna sanitaria	
		30/08/2010	Efluente del feedlot	
		24/11/2010	Efluente del feedlot	
		30/08/2010	Curso de agua próximo	
		30/08/2010	Efluente del feedlot	
VII	AREXHX01.0093	30/08/2010	Efluente del feedlot	<i>rfb</i> _{O157} / <i>fliC</i> _{H7} / <i>stx</i> ₂ / <i>stx</i> _{2c} / <i>eae</i> / <i>ehxA</i>

TABLA 5. Microorganismos indicadores en cursos de agua próximos no expuestos al efluente del feedlot

Coliformes totales	<i>Escherichiacoli</i>	Anaerobios sulf-red.
3,15	3,00	2,30

Nota: Los valores representan el logaritmo decimal de las medianas

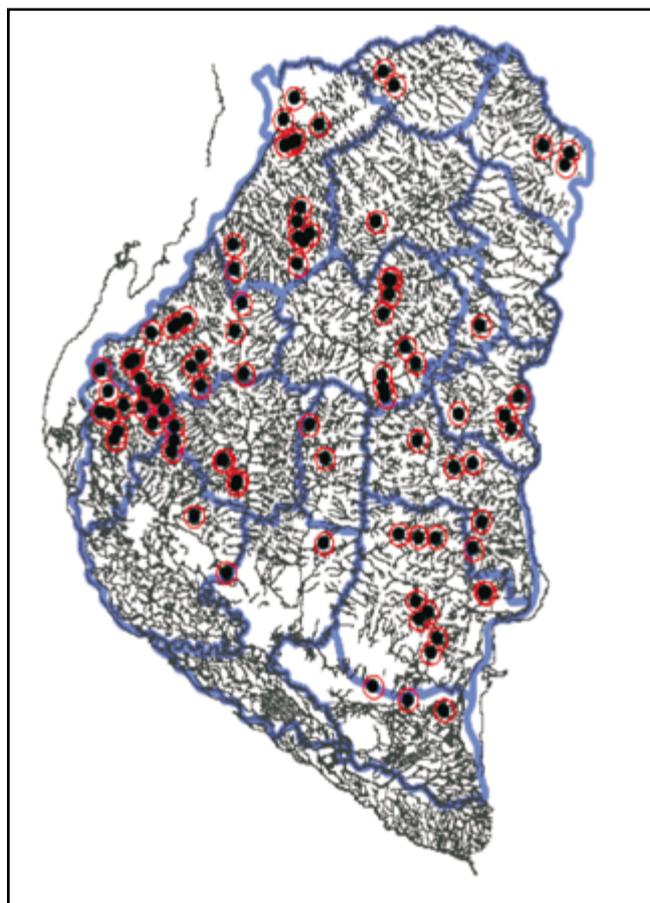


FIGURA 1. Distribución geográfica de los EPEC existentes durante el lapso del proyecto

Muestra: 1500-2000 ml de agua Datos iniciales: temperatura, pH, ubicación Fraccionamiento		
Determinaciones microbiológicas		Determinaciones químicas
Cuantificación de: a. Coliformes totales b. Anaer. sulfito-reductores	<i>E. coli</i> O157:H7/NM 1500 ml hisopo de Moore 16 a 18 h a T.A.	100 ml acidificado ↓ Nitratos y fosfatos
Diluciones decimales en placas seriadas (a) y en tubos gruesos (b)	Resucitación Hisopos en caldo TSB 5 h a T.A.	
	Choque ácido CIH (pH 4,00) 30' a T.A.	
	Separación inmuno-magnética 1 ml + 20 µl partículas IM	
	Aislamiento 30 µl en: SMAC, CHROM, ID	
	Grillado de las colonias presuntivas 30 por muestra (10 de c/medio) en SMAC	
	Extracción de ADN Ansadas en 150 µl Tritón 1X Baño 100 °C 15' Centrifugación 10.000 rpm 5'	
	Tamizaje PCR (<i>rfb</i> _{O157} , <i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂) de los extractos	
	Recuperación de cepas Conservación a -70 °C	
	Caracterización feno-genotípica	

FIGURA 2. Diagrama de flujo del procesamiento adoptado

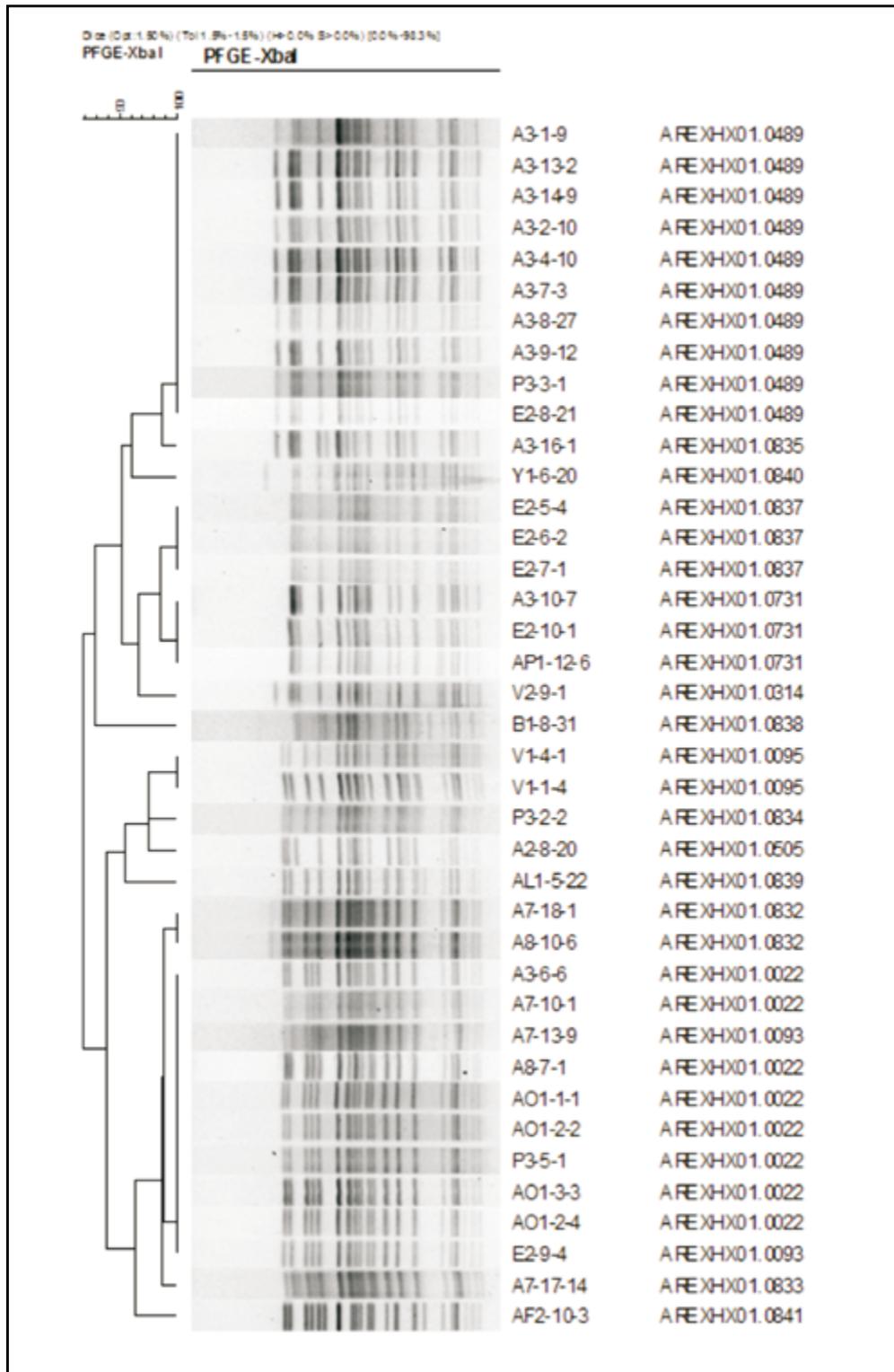


FIGURA 3. Relación clonal de 38 cepas de *E. coli* O157

REFERENCIAS

1. Efluente sin tratamiento
2. Lagunas primarias y secundarias
3. Laguna final y salida del sistema

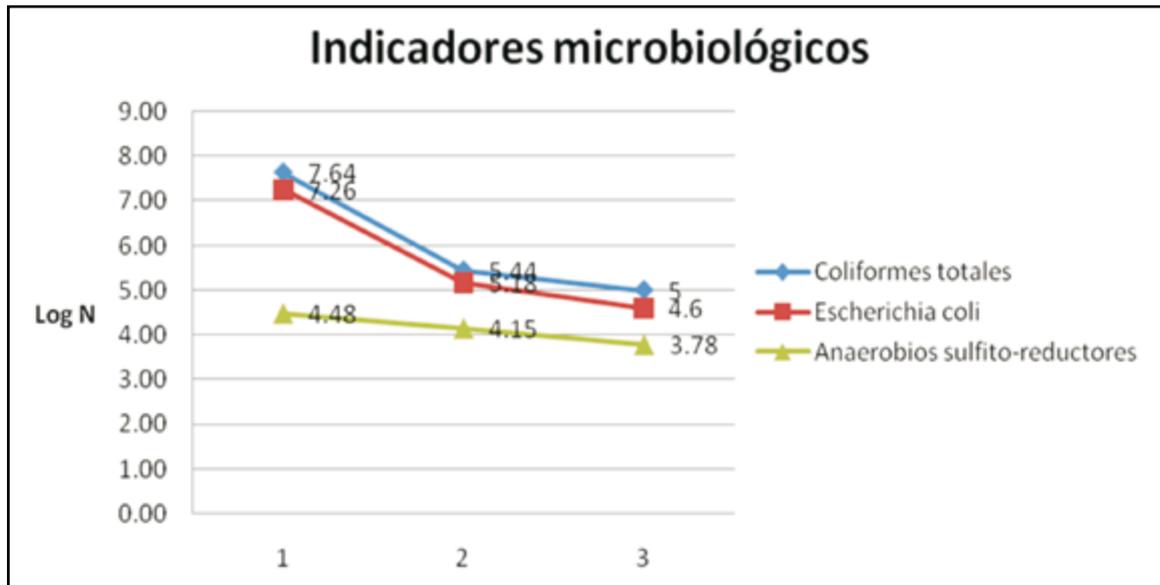


FIGURA 4. Recuento* de Coliformes Totales, *E. coli* y Anaerobios Sulfito-Reductores en el establecimiento estudiado dotado de lagunas sanitarias

Referencias bibliográficas

- BADARACCO, V. 2008. Diagnóstico Ambiental de la Provincia de Entre Ríos. Informe Final. Consejo Federal de Inversiones. Provincia de Entre Ríos.
- BEUTIN, L. 2006. Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Causes and Effects of the Rise of a Human Pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*; 53: 299-305.
- BOLTON, A., STUDDERT, G.A. y ECHEVERRÍA, H.E. 2004. Utilización de estiércol de animales en confinamiento como fuente de recursos para la agricultura. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 1-2: 53-73.
- BOSCHETTI, N.G.; QUINTERO, C.E.; BENAVIDEZ, R.A. & GIUFFRÉ, L. 2003. Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de la Mesopotamia Argentina. *Ciencia del Suelo*; 21: 1-9.
- BOTERO, R. 2004. Estrategias tecnológicas para lograr una empresa ganadera tropical competitiva, rentable y amigable con el ambiente. Memorias Tercer Congreso Internacional de Ganadería y Carnes "Colombian Beef, una mirada profunda al TLC" Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- BREWSTER, D.H.; BROWN, M.I.; ROBERTSON, D.; HOUGHTON, G.L.; BIMSON, J.; SHARP, J.C.M. 1994. An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol. Infect.* 112:441-7.
- BRUCE, M.G.; CURTIS, M.B.; PAYNE, M.M.; GAUTOM, R.K.; THOMPSON, E.C.; BENNETT, A.L.; KOBAYASHI, J.M. 1999. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington. Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
- CALDERWOOD, S.B.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T.; BARRETT, T.J.; GRIFFIN, P.M.; STROCKBINE, N.A. et al. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*; 62: 118-9.
- CALLETTI, M.G.; PETETTA, D.; JAITT, M.; CASALIBA, S. and GIMÉNEZ, A. 2006. Evaluación de costos directos e indirectos del tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico en sus distintas etapas evolutivas. *Medicina*; 66 (Supl. III):22-6.
- EBLEN, D. 2008. Public Health Importance of no-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in the US Food Supply. USDA, FSIS, OPHS.

- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2007. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic types. Scientific opinion of the panel on Biological Hazards.
- FAITH, N.G.; SHERE, J.A.; BROSCHE, R.; ARNOLD, K.W.; ANSAY, S.E.; LEE, M.S.; LUCHANSKY, J.B. AND KASPAR, C.W. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1519-25.
- FELDMAN, K.A.; MOHLE-BOETANI, J.C.; WARD, J.; FURST, K.; ABBOTT, S.L.; FERRERO, D.V.; OLSEN, A.; WERNER, S.B. 2002. A cluster of *Escherichia coli* O157: no motile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Rep.* 117 4:380-5.
- FRIEDMAN, M.S.; ROELS, T.; KOEHLER, J.E.; FELDMAN, L.; BIBB, W.F.; BLAKE, P. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin. Infect. Dis.* 29:298-303.
- GELDREICH, E.E.; FOX, K.R.; GOODRICH, J.A.; CHARK, R.M. and SWERDLOW, D.L. 1992. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Water Res.* 26:1127-37.
- GRANT, S.B.; PENDROY, C.P.; MAYER, C.L.; BELLIN, J.K. and PALMER, C. J. 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3466-9.
- HANCOCK, D.; BESSER, T.; LEJEUNE, J. et al. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Internatl. J. Food Microbiol.* 66:71-8.
- HRUDEY, S.E.; PAYMENT, P.; HUCK, P.M.; GILLHAM, R.W.; HRUDEY, E.J. 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* 47:7-14.
- KARMALI, M.A. 1989. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-37.
- KEENE, W.E.; MC ANULTY, J.M.; HOESLY, F.C.; WILLIAMS, L.P.; HEDBERG, K.; OXMAN, G.L.; BARRETT, T.J.; PFALLER M.A., and 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.
- KUROKAWA, K.; TANI, K.; OGAWA, M. and NASU, M. 1999. Abundance and distribution of bacteria carrying stII gene in natural river water. *Let. Appl. Microbiol.* 28:405-10.
- LEE LANG, A.; TSAI, Y.L.; MAYER, C.L.; PATTON, K.C. and PALMER, C.J. 1994. Multiplex PCR for detection of the heat labile toxin gene and shiga like toxin I y II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *App. Environ. Microbiol.* 60:3145-9.
- LEJEUNE, J.; HANCOCK, D.D. and BESSER, T.E. 1997. *Escherichia coli* O157 in cattle water troughs: A possible on-farm reservoir. Abstracts of the Fifth Annual Food Safety Farm to Table Conference, Northwest Food Safety Consortium, Moscow, ID.
- LEJEUNE, J. 2012. The many ways food can get tainted from farm to fork. FAO. Preventing *E. coli* in Food. En: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli.pdf
- LEJEUNE, J.T.; BESSER, T.E.; MERRILL, N.L.; RICE, D.H. and HANCOCK, D.D. 2001. Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle. *J. Dairy Sci.* 84:1856-62.
- LEJEUNE, J., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D. 2001. Cattle Water Troughs as Reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3053-7.
- MAULE, A. 2000. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 88 (Symp Suppl):71S-8S.
- PATON, J. C. and PATON, A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:450-79.
- PAUNIO, M.; PEBODY, R.; KESKIMAKI, M.; KOKKI, M.; RUUTU, P.; OINONEN, S.; VUOTARI, V.; SIITONEN, A.; LATÍ, E.; LEINIKKI, P. 1999. Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.* 122:1-5.

- PORDOMINGO, A. 2003. Gestión Ambiental en el Feed Lot. Guía de Buenas Prácticas. INTA.
- SAMADPOUR, M.; STEWART, J.; STEINGART, K.; ADDY, C.; LOUDERBACK, J.; MCGINN, M.; ELLINGTON, J.; NEWMAN, T. 2002. Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in Battle Ground Lake, Vancouver, Washington. *J. Environ. Health.* 64:16-20, 26, 25.
- SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. 2000. A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. *Applied and Environmental Microbiol.* 66: 1205-8.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 1998.
- STONEHOUE DP, COMBS SW, CLARK JH AND MOWAT DN. 2008. Economics of an Integrated Manurial Biogas and Protein Recovery System for Beef Cattle. *Canadian Journal of Agricultural Economics* 32 3: 478-497
- SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C.; GRIFFIN, P.M.; TIPPEN, S.; DONNELL, K.D.; GELDREICH, M.; PAYNE, H.D.; MEYHER, E.; WELLS, B.J.; GREENE, A.JR.; BRIGHT, J.G.; BEAN, N.H. and BLAKE, P.A. 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117:812-9.
- TANARO, J.D.; LEOTTA, G.A.; LOUND, L.H., GALLI, L. PIAGGIO, M.C.; CARBONARI, C.C.; ARAUJO, S.; RIVAS, M. 2010. *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 475-7.
- TANARO, J.D.; LOUND, L.H.; LEDRI, S.; SCARPIN, M.; SCHIMPF, M.C.; CASSE, J.S.; LARRIVEY, M.A.; RIVAS, M. 2002. Desarrollo y aplicación de una metodología de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en el Municipio de Gualeguaychú. *Rev. Arg. Microbiol.* 34: 205-12.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 1992.