



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PATÓGENA EN MAMÍFEROS Y
AVES ACUÁTICAS SILVESTRES EN CAUTIVERIO**

Paulina Ignacia Marchant Lobos

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

Patricio Retamal Merino
Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2013

DEPARTAMENTO DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN, PARQUE ZOOLOGICO BUIN
ZOO
FONDECYT 11110398



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PATÓGENA EN MAMÍFEROS Y
AVES ACUÁTICAS SILVESTRES EN CAUTIVERIO**

Paulina Ignacia Marchant Lobos

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO: LISETTE LAPIERRE
PROFESOR CONSEJERO: PILAR OVIEDO

SANTIAGO, CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia amigos y seres queridos por todo su cariño y apoyo incondicional que me brindaron durante no sólo la realización de mi memoria, sino que a lo largo de toda mi carrera. A todos quienes me hicieron reír cuando me vieron frustrada, a todos quienes me sacaron una sonrisa cuando me vieron agobiada, a todos quienes me abrazaron cuando estaba agotada; y a todos quienes celebraron mis triunfos y logros conmigo.

Además deseo dar las gracias a todos quienes hicieron posible esta memoria: mi paciente profesor guía Dr. Retamal, a todo el personal y compañeros del departamento de Medicina Preventiva por enseñarme y ayudarme cada vez que lo requerí.

Por último, y no menos importante, quiero extender mi gratitud a al Dr. Ezequiel Hidalgo, encargado de la investigación en el parque zoológico Buin Zoo, que junto a mi profesor guía nada de esto hubiese sido posible. Además quisiera agradecer a todo el equipo veterinario y de manejo encargado de la contención y atención clínica de los animales, sin los cuales no se habría podido realizar el muestreo.

A todos ellos va dedicada esta memoria, muchas gracias por acompañarme en este camino.

RESUMEN

Escherichia coli STEC (productora de shigatoxinas) es un patógeno emergente importante que causa preocupación a nivel global en salud pública. Su principal reservorio es el ganado vacuno, pero se ha logrado aislar desde distintas especies tanto domésticas como silvestres. En este proyecto se investigó la presencia de STEC en mamíferos silvestres y domésticos dentro del parque zoológico Buin Zoo; Región Metropolitana, Chile.

Se obtuvieron muestras desde 326 mamíferos y aves, mediante torulado rectal o respectivamente. Dichas muestras fueron luego sometidas a procedimientos para el aislamiento bacteriológico y luego a PCR para la detección de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eae*. De estos ensayos se obtuvieron 14 muestras positivas, correspondiendo todas a cepas aisladas desde mamíferos artiodáctilos. Este estudio confirma la presencia de *E. coli* diarreogénicas en los animales del parque zoológico del Buin Zoo.

Palabras clave: *Escherichia coli*, STEC, animales, zoológico, detección.

ABSTRACT

STEC (shiga toxin-producing) *Escherichia coli* is an important emerging pathogen that has become a global problem in public health. Domestic cattle is its main reservoir, but it has been isolated from many different domestic and wildlife species. In this project STEC prevalence was investigated in a zoo (Buin Zoo, Región Metropolitana, Chile) in order to ascertain the presence of such *E. coli* pathotype as an infection risk for both visitors and zoo staff.

326 rectal or cloacal swabs were obtained from mammals and birds respectively, which underwent bacteriological isolation and were later subjected to a PCR analysis for *stx1*, *stx2* and *eae* virulence genes detection. 14 samples positive to STEC were obtained, which all belonged to artiodactils strains. This study confirms the presence of diarrheogenic *E. coli* in zoo animals at Buin Zoo.

Key Words: *Escherichia coli*, STEC, animals, zoo, detection.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885, considerándose como hospedero natural del tracto entérico tanto animal como humano. Desde el año 1950 comenzó a asociarse como agente etiológico de enfermedades como enteritis, infecciones urogenitales entre otras patologías, convirtiéndose en un problema importante de salud pública. No obstante, se han descrito diversos patotipos de *E. coli*, de los cuales no todos están asociados a patologías, ni de la misma severidad. Aunque es normalmente considerada como etiología de enfermedades transmitidas por alimentos, asociada a contaminación con materia fecal humana; algunos patotipos son capaces de producir infecciones zoonóticas. Dentro de esta categoría se encuentra el patotipo STEC, al cual se le atribuyen diversos brotes de enfermedad en humanos asociados a contacto directo con animales. Lo anterior significa un grave problema de salud pública, particularmente en áreas laborales con contacto estrecho con animales o con animales en contacto con descarga de aguas tratadas.

A nivel internacional, dentro de las investigaciones realizadas para establecer la presencia de *E. coli* en animales, existen escasas publicaciones relacionadas con su detección desde reservorios animales. Dichos estudios están normalmente asociados a casos puntuales donde el contacto entre humanos y animales portadores actúa como factor determinante en brotes de enfermedades, por lo que el mayor interés radica en detectar la presencia de patotipos zoonóticos en especies sospechosas. En Chile, existen pocos estudios destinados a detectar *E. coli* desde reservorios animales. El presente proyecto tiene como objetivo la detección de *E. coli* STEC desde animales silvestres en cautiverio en un zoológico de la región Metropolitana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual se compone de bacilos Gram negativos aeróbicos o anaeróbicos facultativos (Henderson, 2008). Es normalmente comensal del intestino grueso de animales homeotermos, siendo generalmente apatógena en humano y distintas especies de mamíferos y aves, transmitiéndose mediante vía oro-fecal. En animales no suelen causar patología (Leotta *et al.*, 2006), mientras que en seres humanos puede provocar enfermedad debido a contaminación con material fecal (Souza *et al.*, 1999). La enfermedad, no obstante, no es provocada por todos los tipos de *E. coli*, sino por patotipos específicos, los cuales suelen ser causa importante de enfermedad y mortalidad, particularmente en niños en países subdesarrollados (Souza *et al.*, 1999).

Existen distintas formas patogénicas o patotipos de *E. coli*, (O'Sullivan *et al.*, 2007) provocando enfermedades tanto entéricas, como extraintestinales (Wasteson, 2001). Estas diferencias se deben a distintos factores de colonización, factores de virulencia y genes asociados a la virulencia específicos para cada patotipo (O'Sullivan *et al.*, 2007). Las principales categorías son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de shigatoxinas o verotoxinas (STEC/VTEC) y dentro de éste enterohemorrágica (EHEC) (Wasteson, 2001, Naylor *et al.*, 2005).

Los patotipos ETEC se caracterizan por producir fimbrias adhesivas y enterotoxinas, las cuales se clasifican en termoestables o termolábiles (O'Sullivan *et al.*, 2007). ETEC es causante de las diarreas del viajero en humano, además de provocar diarrea en animales jóvenes. No obstante, no se considera este patotipo zoonótico debido a que las fimbrias de adhesión son específicas para cada especie (Wasteson, 2001).

Los patotipos EPEC no producen toxinas, pero al adherirse producen lesiones denominadas como “attaching effacing lesions” que comprometen la integridad y apariencia del intestino grueso, invadiendo luego las células epiteliales. Es causa importante de diarrea en niños, por consumo de comida y agua contaminada con heces humanas (Wasteson, 2001).

Se desconoce aún el mecanismo patológico de EAEC (O'Sullivan *et al.*, 2007), aunque se ha asociado con diarrea crónica en niños. *In vitro* se adhieren a células, formando un patrón agregativo, y ciertas cepas producen enterotoxinas termoestables (Wasteson, 2001).

Los patotipos EIEC producen enfermedad en humanos de forma similar a *Shigella spp.*, ya que a diferencia de otros patotipos de *E. coli* son capaces de invadir y formar colonias dentro de las células epiteliales del colon (Wasteson, 2001). Produce una diarrea con presencia de sangre y mucus, y se asocia a consumo de agua o alimentos contaminados (O'Sullivan *et al.*, 2007).

El patotipo STEC (o VTEC), se caracteriza por producir shiga toxinas o verotoxinas, denominándose también STEC o VTEC (Naylor *et al.*, 2005). Reciben esta denominación ya que actúan como toxinas para las células Vero *in vitro*, además de ser similares a las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae* (Wasteson, 2001). Dentro de este patotipo es importante destacar el rol patógeno del EHEC, el cual se caracteriza por provocar diarreas sanguinolentas en sus hospedadores; y, en ciertas ocasiones, el síndrome urémico hemolítico (HUS). Por otro lado, el patotipo EHEC posee un sistema de adhesión similar al de EPEC (Chaudury y Henderson, 2012). Tanto STEC como EHEC provocan distintas patologías diarreogénicas, desde diarreas sanguinolentas o no sanguinolentas, colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico.

Se consideran a los rumiantes, particularmente los bovinos, como su reservorio natural (Leotta *et al.*, 2006). En animales, se ha demostrado su rol patológico en algunos animales, como en la disentería del ternero en bovinos y “Alabama rot” en caninos (Wasteson, 2001).

STEC presenta una alta sobrevivencia en materia fecal, especialmente a bajas temperaturas y alta humedad. También puede sobrevivir en el agua que se ha contaminado con heces. Debido a lo anterior, la contaminación fecal es el principal factor de persistencia en el ambiente, lo cual contribuye a la transmisión de STEC a humanos al contaminar alimentos y cursos de agua, además del contacto directo (Wasteson, 2001).

Además de la anterior clasificación, generalmente se distinguen los distintos patotipos según sus serotipos. Entre ellos destaca el STEC O157:H7, el cual fue atribuido por primera vez en 1983 como causal de enfermedad en humanos de origen animal (Gyles,

2006) y responsable de la mayoría de los brotes de enfermedad producida por alimentos (Steinmuller *et al.*, 2006).

Desde hace algunos años se registran diversos brotes de infección en humanos por *E. coli*, y la Organización Mundial de la Salud considera al serotipo O157:H7 emergente (Chaudury y Henderson, 2012). Entre estos brotes, algunos han sido asociados con contacto animal estrecho, particularmente en zoológicos de contacto (DebRoy y Roberts, 2006). Al respecto, tanto las autoridades sanitarias oficiales (Pritchard *et al.*, 2009) como instituciones privadas, (Fox y García, 2003) han dedicado recursos para diagnosticar distintos patógenos con potencial riesgo zoonótico en instalaciones como zoológicos, granjas educativas o ferias agrícolas. Por ejemplo, en Estados Unidos, la mayoría de los brotes han sido atribuidos a distintas cepas de *Salmonella enterica*, *Campylobacter spp.*, *Cryptosporidium spp.*, y cepas verotoxigénicas de *E. coli*, y en especial al serotipo O175 (Steinmuller *et al.*, 2006).

En el Reino Unido, se ha visto un aumento importante de los zoológicos de contacto, además de distintos tipos de instituciones en donde se estimula el contacto animal, como granjas educativas. Esto ha provocado también un aumento de los casos reportados de infecciones por STEC (Stirling *et al.*, 2007a).

Debido al alza de casos clínicos de diarrea por STEC, se han realizados diversos estudios en animales de dichos establecimientos a fin de detectar la presencia de patotipos de *E. coli*, especialmente STEC. Se han obtenido resultados diversos, desde prevalencias de 0,1% (Leotta *et al.*, 2006; Keen *et al.*, 2007 hasta un 50,8% (Leotta *et al.*, 2006). Esas diferencias pueden deberse a distintos métodos de diagnóstico, distintas especies estudiadas, distintas condiciones sanitarias de los animales muestreados en el estudio; o una combinación de los factores anteriores (Dobbin *et al.*, 2005; Stirling *et al.*, 2007a; Keen *et al.*, 2007; Pritchard *et al.*, 2009). Existen también estudios, dedicados a identificar cuáles especies de animales silvestres son reservorios naturales (Dobbin *et al.*, 2005; Stirling *et al.*, 2007b); y en estudios más allá de la pesquisa del patógeno, se analiza además sus características de resistencia microbiana y su genotipificación (Souza *et al.*, 1999; Higgins *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Chaudury y Henderson, 2012)

A nivel nacional, existen escasas publicaciones relacionadas con la transmisión zoonótica de *Escherichia coli*. A nivel de detección en animales se realizó un estudio en donde se aisló EHEC desde bovinos y cerdos de matadero, obteniendo como resultado el aislamiento en un número importante (28,7% y 68,3% respectivamente), sugiriendo tanto a bovinos como porcinos como reservorios importantes de EHEC en Chile (Borie *et al.*, 1997). En el ámbito sanitario es aún considerada mayormente como enfermedad transmitida por alimentos. Durante el año 2011, se notificaron 0,5 casos por cada 100.000 habitantes. Desde los últimos ocho años la incidencia ha ido en aumento (Ministerio de Salud, 2012a). La edad de los pacientes ha ido también en aumento, y durante el mes de Marzo del año pasado se reportó una infección con STEC cuyo único factor de riesgo fue el contacto con animales de granja (Ministerio de Salud, 2012b).

Considerando lo anterior, es importante hacer un primer acercamiento al diagnóstico de STEC en animales silvestres cautivos en parques zoológicos, abarcando tanto animales en contacto directo con el público como los de acceso restringido a éste.

En los estudios realizados a fin de pesquisar el agente directamente desde los animales, normalmente se utiliza una combinación de cultivo y luego diagnóstico molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando blancos genéticos específicos para la detección del gen codificador de la intimina (*eae*) característicos de las cepas EPEC y EHEC y los de shigatoxinas (genes *stx1* y *stx2*) (Fox y García, 2003; Leotta *et al.*, 2006).

El método de PCR múltiple desarrollado por Vidal *et al.* (2005), permite la identificación rápida y eficaz de distintos patotipos de *E. coli*, incluso diferenciando enzimas termolábiles o termoestables de *E. coli* enterotoxigénica, o entre las distintas enzimas de *E. coli* productora de shigatoxinas, además de identificar los distintos genes asociados a STEC (Vidal *et al.*, 2005).

Este proyecto propone el diagnóstico de STEC en animales silvestres en cautiverio en centros de exhibición, además de animales en contacto directo con el público, y utilizando para ello un protocolo de PCR múltiple.

HIPÓTESIS

Cepas de *Escherichia coli* STEC se encuentran infectando a mamíferos terrestres y aves acuáticas silvestres en cautiverio.

OBJETIVO GENERAL

Detección de patotipos de *E. coli* en mamíferos terrestres y aves acuáticas silvestres cautivos en el parque zoológico Buin Zoo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de *Escherichia coli* STEC desde mamíferos silvestres y aves acuáticas en cautiverio.
- Identificar genes asociados a virulencia en estas cepas de *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras:

Las muestras de heces fueron tomadas desde aves y mamíferos en cautiverio del zoológico Buin Zoo, el cual cuenta con 107 carnívoros, 53 primates y 101 ungulados, entre otros animales en exhibición. De ellos, según el calendario de manejo preventivo de salud de éstos se muestrearon 60 carnívoros, 30 primates y 95 ungulados, dando un tamaño muestral de 56,07%, 56,5% y 94,05%, respectivamente. En cuanto a las aves acuáticas, el zoológico consta de 196 ejemplares, de los cuales se consideraron para el proyecto 115 de ellos, dando un tamaño muestral de 58,97%. En total, para este estudio se contemplaron muestras de 326 ejemplares. Los detalles de los animales a muestrear se encuentran en el anexo 1.

El muestreo fue apoyado por el equipo especialista de clínica y contención del zoológico. La obtención de la muestra se realizó mediante la introducción de una tórula de algodón, por el recto o cloaca según correspondiera, durante la contención del animal. Luego, las tórulas fueron trasladadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron procesadas según el siguiente protocolo.

Día 1:

- Se agregaron 5 mL de agua peptonada tamponada (APT) estéril en un tubo de ensayo estéril. Luego se inocularon las tórulas con dicho medio, y se incubaron entre 18 a 24 h a 42 °C.

Día 2:

- Una vez verificado el crecimiento en el caldo APT, se sembró la placa por agotamiento de una alícuota en agar McConkey, y luego se incubó 24 h a 37°C.

Día 3:

- Se seleccionaron cinco colonias compatibles (lactosa +) de cada muestra, y se re-aislaron en agar McConkey, incubándolas nuevamente durante 24 h a 37 °C.

Día 4:

- Las placas fueron refrigeradas a 5°C por 24 a 48 h, hasta la realización del PCR

PCR:

Se procedió a la realización de un PCR múltiple para la identificación de genes asociados a virulencia de *E. coli*. Se utilizaron como controles positivos cepas *E. coli* STEC de referencia 933J (*stx1*, *stx2* y *eae*), C600J (*stx1*), C600W (*stx2*), 2348/69 (*eae*) (Vidal *et al.*, 2005).

El ensayo de PCR múltiple se realizó con un volumen final de 20 uL, el cual se constituyó de 1X buffer PCR (Invitrogen ®), 1,5 mM MgCl₂, 1X desoxinucleótido trifosfato, 2 pmol de cada partidor, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen ®), 3 uL de DNA templado y H₂O destilada ionizada (Merk ®). Se incluyó un tubo con la mezcla anterior pero sin muestras como control negativo.

Para la extracción del DNA se creó un “pool” con las cinco cepas seleccionadas de cada muestra, que luego se llevaron a ebullición en agua destilada estéril por 20 min. Enseguida se procedió a centrifugar a 2000 x g durante 3 min, y se utilizó el sobrenadante obtenido directamente como templado de la reacción. Para determinar la cantidad y calidad del DNA extraído se realizó una espectrofotometría a 260nm y 280nm.

La reacción consideró una denaturación inicial de 94°C durante 5 min, y luego 35 ciclos que consistirá en un paso de denaturación de 1,5 min a 94°C, una hibridación de 1,5 min a 60°C y una extensión de 1,5 min a 70°C. Finalmente, se realizó una elongación por 5 min a 72°C. Los productos del PCR se visualizaron en transiluminador después de una electroforesis en agarosa al 1% y tinción con RedGel®.

En caso de detectarse algunos de los genes en estudio, fueron analizadas por separado las cinco colonias sospechosas en una nueva reacción de PCR para identificar aquella que contiene la o las secuencias blanco.

Pruebas bioquímicas:

Las colonias que resultaron positivas mediante PCR fueron analizadas por pruebas bioquímicas para comprobar su identidad; utilizando las pruebas de producción de Indol, Rojo de Metilo, Vogues-Proskauer y Citrato (Kolarschmidt *et al.*, 2008).

Pruebas Estadísticas:

Se realizó la prueba de X^2 para la identificación de asociación estadística entre especie, clase, sexo y edad de los animales muestreados.

Bioseguridad:

Durante el muestreo se trabajó según las normas de bioseguridad del hospital clínico de Buin Zoo, siendo obligatorio el uso de guantes durante la manipulación y la recolección de las muestras, para luego lavar y desinfectar las manos con alcohol 70°. Durante la manipulación de primates fue además obligatorio el uso de mascarilla.

Según las buenas prácticas de laboratorio, las manos se lavaron y luego desinfectaron con alcohol 70° tanto al entrar como al salir del laboratorio, y se utilizó siempre el delantal cerrado, guantes desechables y el pelo recogido.

Se realizó el almacenamiento de las placas Petri en recipientes herméticos en un refrigerador dispuesto para este fin, con su identificación correspondiente.

Los residuos fueron dispuestos en bolsas, las cuales después de su uso se esterilizaron antes de ser eliminados.

La manipulación de las muestras y el aislamiento bacteriano se llevó a cabo en la campana de bioseguridad tipo IIA del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas.

RESULTADOS

De los 326 animales muestreados, se obtuvieron un total de 14 (4,29%) muestras positivas a los genes pesquisados en el estudio. Todas las muestras positivas correspondieron a ejemplares de la clase mamíferos, pertenecientes a la colección de exhibición del zoológico, sin contacto directo con el público. De ellos, dos pertenecieron a gacelas de Thomson (*Eudorcas thomsonii*), siete a ciervos dama (*Dama dama*) y tres a muflones (*Ovis orientalis musimon*), además de muestras positivas individuales de llama (*Lama glama*) y guanaco (*Lama guanicoe*). Estos resultados determinaron asociación estadística entre la condición de infección con la especie ($p= 0,0015$) y la clase ($p=0,0030$) de los animales investigados. Los resultados se resumen en el anexo 3.

De la totalidad de muestras positivas se obtuvieron distintos resultados de positividad, obteniéndose cultivos individuales positivos a *stx1*, *stx2*, y a *stx1* y *stx2* simultáneamente. No se obtuvieron PCR positivos para el gen *eae* en ninguno de los animales. En cinco de los 14 animales positivos (tres ciervos dama, una llama y un guanaco respectivamente) se lograron aislar colonias cuyos resultados a la prueba de PCR dieron resultados individualmente diferentes (véase Anexo 4).

DISCUSIÓN

Dentro de la investigación de fauna silvestre como reservorio de agentes patógenos, la investigación de *E. coli* patógena es un área relativamente inexplorada. Debido a los escasos reportes de prevalencia de STEC en animales no domésticos en la literatura internacional, no existen aún datos concretos que permitan comparar los distintos resultados obtenidos en diferentes estudios. Asimismo, existe el sesgo de la investigación específica del serotipo O157:H7, lo cual no permite contrastar de manera objetiva los resultados de cada estudio. Por otro lado, debido a la utilización de métodos de análisis y/o detección diferentes es difícil hacer comparaciones directas entre ellos (Mora *et al.*, 2012). Asimismo, en el caso de parque zoológicos, las comparaciones entre ellos se dificulta debido al manejo particular que cada parque pueda tener de cada animal, ya sea en su mantención u obtención de cada muestra (Keen *et al.*, 2007).

Al contrastar investigaciones similares, la mayoría de éstas, al incluir especies de distintos géneros, obtienen una mayor proporción de resultados positivos de genes *stx* mediante método PCR en mamíferos artiodáctilos, particularmente rumiantes tanto domésticos como silvestres (DebRoy y Roberts, 2006; Leotta *et al.*, 2006; Ishii *et al.*, 2007; Baldy-Chudzik *et al.*, 2008; Pritchard *et al.*, 2009), en concordancia con el reservorio principal de STEC (Gyles, 2006). En este trabajo se obtuvo un 14.73% de artiodáctilos positivos, incidencia menor a la obtenida en los estudios de Leotta *et al.* (2006), Pritchard *et al.* (2009) y Díaz-Sánchez *et al.* (2012); siendo de 50,8%, 35,7% y 22,02% respectivamente. Cabe recordar que las especies consideradas en cada investigación difieren importantemente entre ellas; cuando se incluyen animales domésticos, la mayoría de las muestras positivas corresponden a bovinos y ovinos (DebRoy y Roberts, 2006, Pritchard *et al.*, 2009), mientras que en los estudios más orientados a fauna silvestre rara vez coinciden las especies incluidas en cada uno de ellos (Leotta *et al.*, 2006, Pritchard *et al.*, 2009, Stirling *et al.*, 2007b; Keen *et al.*, 2007).

En cuanto a resultados en aves silvestres, existen escasas investigaciones sobre detección de STEC en éstas, y son aún menos las que incluyen tanto a aves como mamíferos (DebRoy y Roberts, 2006 Ishii *et al.*, 2007, Stirling *et al.*, 2007b, Keen *et al.*, 2007; Pritchard *et al.*, 2009). Son igualmente escasas las investigaciones de STEC específicas para aves (Steele *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2011; Milani *et al.*, 2012). En las investigaciones donde se incluyeron a especies tanto silvestres como domésticas no se detectaron genes de virulencia en aves, salvo en el realizado por Pritchard *et al.* (2009). En el caso de estudios específicos en aves, se pueden encontrar resultados para STEC negativos (Milani *et al.*, 2012), similar a nuestros resultados, o con prevalencias entre 1,82% (Oh *et al.*, 2011) a 6,65% (Pedersen *et al.*, 2006) según la literatura consultada. Cabe destacar que en los estudios en los cuales se lograron detectar genes de virulencia usaron tamaños muestrales mayores a los que se utilizaron en este proyecto (Steele *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2011). Si bien es factible el estado portador de STEC en aves, existen pocos casos de zoonosis por contacto con aves silvestres. En un estudio realizado en Reino Unido sobre un caso de enfermedad por STEC O157:H7 (Ejidokun *et al.*, 2006). se logró encontrar como única fuente posible de contagio

a cuervos, luego que se descartaran todas las otras fuentes animales posibles. Por ende es factible que exista un riesgo de zoonosis por aves, pero suele ser aparentemente menor que por los animales portadores típicos como ganado vacuno u otros rumiantes.

Según la bibliografía consultada hasta la fecha, éste es el primer intento de detección de STEC con resultados positivos en gacela de Thomson. En cuanto a ciervo dama, Díaz-Sánchez *et al.*(2013) reportaron la presencia de los genes *stx2* y *exhA* en heces de un cadáver de ciervo dama silvestre (Díaz-Sánchez *et al.*, 2013). En el estudio realizado por Leotta *et al.* (2006) se detectó la presencia de genes *stx* en ciervo dama, pero no se especifica el subtipo. En cuanto a muflones, éstos han sido escasamente estudiados: han sido incluidos en los muestreos de investigaciones realizadas por García-Sánchez *et al.* (2007) y Díaz-Sánchez *et al.* (2013), pero sin obtener resultados positivos. Por otro lado, en el trabajo realizado por Leotta *et al.* (2006) tres muflones dieron resultados positivos para genes *stx1* y *stx2*.

Respecto a camélidos sudamericanos, éstos fueron los únicos mamíferos endémicos con resultados positivos en esta investigación. Los camélidos sudamericanos suelen incluirse dentro de los muestreos de investigaciones de STEC tanto enfocado en animales de exhibición (Leotta *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2007b; Keen *et al.*, 2007; Pritchard *et al.*, 2009), como en animales de granja (DebRoy y Roberts, 2006; Pritchard *et al.*, 2009). Sin embargo, los tamaños muestrales tienden a ser muy reducidos (n 1-26). En los estudios cuyo objetivo es la detección de STEC y no de serotipos de STEC específicos se reportan altas prevalencias para genes *stx*, siendo de 50% para el estudio de Leotta *et al.* (2006) y 76.47% para Pritchard *et al.* (2009). En una investigación que contempló 12 meses de muestreo se obtuvo un porcentaje estimado menor al 2%, pero sólo considerando el serotipo O157 (Featherstone *et al.*; 2011). En el caso específico de los guanacos Mercado *et al.* (2004) sugiere el rol patogénico de STEC serotipo O26:H11 en diarrea neonatal.

De acuerdo a la literatura revisada en este estudio, ha ocurrido anteriormente el hallazgo de genes *stx1* y *stx2* sin encontrar el gen *eae* en las muestras fecales (Leotta *et al.*, 2006; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). A pesar de que el riesgo de zoonosis es menor debido a lo anterior, existe aún la probabilidad de enfermedad: si bien la presencia del gen *eae* es considerada como un factor de riesgo, existen otras cepas de STEC capaces de provocar

diarrea sanguinolenta sin la presencia de este gen: la presencia *per se* de *stx* provoca lisis de las células endoteliales, lo cual contribuyen a la diarrea sanguinolenta. Asimismo, existen otros genes de virulencia putativos asociados a patología, nos siempre compartido por todas los serotipos de STEC, como por ejemplo la presencia del gen de la entero hemolisina (*Ehly*), que suele estar asociado a enfermedad, pero puede encontrarse en STEC tanto positivas como negativas a *eae* (Gyles, 2006).

Entre los animales muestreados en esta investigación se incluyeron animales rescatados desde su hábitat natural, pero las muestras obtenidas resultaron negativas. Si bien los animales estresados por enfermedad, captura y/o cautiverio tienden a excretar más bacterias patógenas (Steele *et al.*, 2005), no existe aún evidencia precisa de una relación directa entre el nivel de excreción de STEC y el estrés, por lo que serían necesarios mayores estudios al respecto (Berry y Wells, 2007).

Los jabalíes incluidos en el estudio estaban siendo hospedados en el zoológico para su posterior consumo. Si bien no se detectaron genes de virulencia en sus heces, existe en Chile un creciente aumento de la producción y exportación de carne de jabalí; y se estima que gran parte de los criaderos no están inscritos en el registro nacional (Anón, 2010), lo cual implica posiblemente condiciones de manejo inadecuadas o de calidad sanitaria desconocida (Skewes y Morales, 2006). En España se ha detectado la presencia de serotipos de *E. coli* asociados con infecciones en humanos en carne de jabalí destinada a consumo humano (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012, Díaz-Sánchez *et al.*, 2013).

No se encontraron resultados positivos en los animales con mayor contacto con el público (baby zoo). No obstante, la diseminación de STEC por parte de los animales portadores tiende a ser esporádica y estacional (Synge, 2000). Por otro lado, no se puede descartar otras fuentes de infección mediante fomites contaminados (Gyles, 2006). Asimismo, es importante considerar el riesgo de transmisión de STEC para funcionarios del zoológico, tanto cuidadores como personal veterinario (Stirling *et al.*, 2007b). Es por ello que se requiere la capacitación de funcionarios y la educación de los visitantes respecto a las medidas sanitarias en establecimientos con contacto animal a fin de optimizar la experiencia tanto recreativa como educativa de dichas instancias.

Si bien en este estudio pudo comprobarse la presencia de genes patógenos en animales silvestres, no es posible establecer la virulencia de las cepas halladas. Tampoco es posible aún determinar el origen de dichas cepas ni su potencial riesgo zoonótico. A pesar de que los animales de los cuales se obtuvieron las muestras se encontraban clínicamente sanos, las cepas de STEC que provocan enfermedad en humanos suelen infectar pero no enfermar a sus hospederos animales (Gyles, 2006). Existen diversos factores que conllevan a la infección por parte de STEC para producir enfermedad además de la presencia de los genes de virulencia típicos como los putativos (Nguyen y Sperandio, 2012). Para una aproximación a la determinación de la virulencia y patogenicidad de las muestras obtenidas sería necesario realizar ensayos *in vitro* o *in vivo*, análisis de PCR para buscar la presencia de otros genes asociados a virulencia y la serotipificación de éstas. En esta investigación se comprobó la presencia de genes de virulencia de *E. coli* en especies de fauna silvestre en condiciones de cautiverio. Ante la heterogeneidad de los resultados presentes, y debido al bajo número muestral y diversidad de las especies abarcadas, son necesarios mayores estudios para comprender el rol de distintos artiodáctilos silvestres como posibles reservorios de STEC. También es importante la investigación de STEC en camélidos sudamericanos en particular, especialmente en Sudamérica debido al manejo de éstos con fines productivos. Además, se requieren estudios adicionales de STEC en animales de consumo y el análisis de la excreción de STEC bajo distintas condiciones de estrés. Asimismo, es necesaria la identificación de las cepas obtenidas según su serotipo y así establecer su correcto potencial zoonótico, a fin de determinar el riesgo tanto para personal y profesionales que trabajan directamente con dichos animales, potenciales consumidores, y público general que pueda tener contacto directo con animales.

BIBLIOGRAFÍA

- ANÓN.** 2010 Resultados y Lecciones en Producción de Carnes Exóticas: Proyecto de Innovación en XIV Región de los Ríos. Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Chile. 52 p.
- BALDY-CHUDZIK, K.; MACKIEWICZ, P., STOSIK, M.** 2008. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol* 131: 173-184.
- BERRY, E.; WELLS, J.** 2010. *Escherichia coli* O157:H7: Recent Advances in Research on Occurrence, Transmission, and Control in Cattle and the Production Environment. *Advances in Food and Nutrition Research* 70: 67-117.
- BORIE, C.; MONREAL, Z.; GUERRERO, P.; SANCHEZ, M.L.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; PRADO, V.** 1997. Prevalencia y Caracterización de *Escherichia coli* Enterohemorrágica Aisladas de Bovinos y Cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch. Med. Vet.* 29 (2): 205-212
- CHAUDURY, R.; HENDERSON, I.** 2012. The Evolution of *Escherichia coli* Phylogeny. *Infect Genet Evol* 12: 214-226.
- DEBROY, C.; ROBERTS, E.** 2006. Screening petting Zoo Animals for the Presence of Potentially Pathogenic *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest* 18:597-600.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, A.; HERRERA-LEÓN, S.; HANNING, I.; VIDAL, E.** 2012. Detection and Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Game Meat and Ready-to-eat Meat Products. *Int J Food Microbiol* 160 (2): 179-182.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, S.; SÁNCHEZ, S.; HERRERA-LEÓN, S.; PORRERO, C.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; MORA, D.; MATEO, R.; HANNING, I.; VIDAL, E.** 2013. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in Large Game Animals Intended for

Consumption: Relationship with Management Practices and Livestock Influence. Vet Microbiol 163 (3): 274-281.

- DOBBIN, G.; HARIHARAN, H.; DAOUST, P.Y.; HARIHARAN, S.; HEANEY, S.; COLES, M.; PRICE, L.; MUCKLE, A.** 2005. Bacterial Flora of Free-living Double-crested Cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with Reference to Enteric Bacteria and Antibiotic Resistance. Comp Immunol Microb 28: 71-82.
- EJIDOKUN, O.; WALSH, A.; BARNETT, J.; HOPE, Y.; ELLIS, S.; SHARP, M. PAIBA, G.; LOGAN, M.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T.** 2006. Human Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 infection linked to birds. Epidemiol Infect 134 421-423.
- FEATHERSTONE, C.; FOSTER, A.; CHAPPELL, S.; CARSON, T.; PRITCHARD, G.** 2011. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in Camelids. Vet Rec 186 (7): 194-195.
- FOX, J.; GARCÍA, A.** 2003. The Rabbit as a New Reservoir Host of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Emerg Infec Dis 9 (12): 1592-1599.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ, S.; RUBIO, R.; PEREIRA, G.; ALONSO, J.; HERMOSO de MENDOZA, J.; REY, J.** 2007. Presence of Shiga Toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a Survey of Wild Artiodactyls. Vet Microbiol 121 (3): 373-377.
- GYLES, C.** 2006. Shiga-toxin Producing *Escherichia coli*: an Overview. J Anim Sci 85: 45-62.
- HENDERSON, H.** 2008. Direct and indirect zoonotic transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. JAVMA 232 (6): 848 -859.
- HIGGINS, J.; HOHN, C.; HORNOR, S.; FRANA, M.; DENVER, M.; JOERGER, R.** 2007. Genotyping of *Escherichia coli* from Environmental and Animal Samples. J Microbiol Meth 70: 227-235.

- ISHII, S.; MEYER, P.; SADOWSKY, M.** 2007. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources. *Appl Environ Microb* 73 (18): 5703-5710.
- KEEN, J.; DURSO, L.; MEEHAN, T.** 2007. Isolation of *Salmonella enteric* and Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157 from Feces of Animals in Public Contact Areas of United States Zoological Parks. *Appl Environ Microb* 73 (1): 362–365.
- KOLERSCHMIDT, D.; MUSSER, K.; DUMAS, N.** 2008. Identification of Aerobic Gram-negative bacteria.**En:** Practical Handbook of Microbiology. 2ª Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Ratón, Estados Unidos. pp. 72-74.
- LEOTTA, G; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M.** 2006. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Vet Microbiol.* 118: 151-157.
- MERCADO, E.; RODRÍGUEZ, S.; ELIZONDO, A.; MARCOPPIDO, G.; PARREÑO, V.** 2004. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. *J Clin Microbiol* 42 (10): 4809-4811.
- MILANI, J.; WILSON, H.; ZICCARDI, M.; LEFEBVRE, R.; SCOTT, C.** 2012. Hematology, Plasma Chemistry, and Bacteriology of Wild Tundra Swans (*Cygnus columbianus*) in Alaska. *J Wildlife Dis* 48 (1): 212-215.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2012a. Informe de Vigilancia de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC) Año 2011 [en línea] Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.
<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/STEC/STEC_2011.pdf> [consulta: 27-05-2012]
- MINISTERIO DE SALUD.** 2012b. Informe de Vigilancia de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga (STEC) (DS N° 158/04, Artículo 9°) Enero – Marzo de 2012 [en

línea] Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.
<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/STEC/STEC_2012.pdf>[consulta: 27-05-2012]

- MORA, A.; LÓPEZ, C.; DHABI, G.; LÓPEZ-BECEIRO, A.; B FIDALGO, L.; DÍAZ, E.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO J.** 2012. Seropathotypes, Phylogroups, *Stx* Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates. *Appl Environ Microb* 78 (8): 2578-2585.
- NAYLOR, S.; GALLY, D.; LOW, J.** 2005. Entehaemorrhagic *E. coli* in Veterinary Medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 419-441.
- NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V.** 2012. Enterohemorrhagic *E.coli*(EHEC) Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 1-7.
- OH, J.; KANG, M.; HWANG, H.; AN, B.; KWON, J.; KWON, Y.** 2011. Epidemiological investigation of *eaeA*-positive *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* strains isolated from healthy wild birds. *J Microbiology* 49 (5): 747-752.
- O’SULLIVAN, J.; BOLTON, D.; DUFFY, D.; BAYLIS, C.; TOZZOLI, R.; WASTESON, Y; LOFDAHL, S.** 2007. Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. Asthon Food Research Centre. Dublín, Irlanda. 34 p.
- PEDERSEN, K.; CLARK, L.; ANDELT, W.; SALMAN M.** 2006. Prevalence Of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in Rock Pigeons Captured inFort Collins, Colorado. *J Wildlife Dis* 42 (1): 46-55.
- PRITCHARD, G.; SMITH, R.; ELLIS-IVERSEN, J.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.** 2009. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in animals on public amenity premises in England and Wales, 1997 to 2007. *Vet Rec* 164:545–549.

- SKEWES, O.; MORALES, R.** 2006. Crianza de Jabalí (*Sus Scrofa L.*) en Chile. Distribución, Tamaño y Aspectos Básicos de Manejo. *Agro-Ciencia* 22(1): 29-36.
- SOUZA, V.; ROCHA, M.; VALERA, A.; EGUIARTE, L.** 1999. Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* on Different Continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8): 3373-3386.
- STEELE, C.; BROWN,R.; BOTZLE, R.** 2005. Prevalences of Zoonotic Bacteria Among Seabirds in Rehabilitation Centers Along the Pacific Coast of California and Washington, Usa. *J Wildlife Dis* 41 (4): 735-744.
- STEINMULLER, N.; DEMMA, L.; BENDER, J.; EIDSON, M.; ANGULO, F.** 2006. Outbreaks of Enteric Disease Associated with Animal Contact: Not Just a Foodborne Problem Anymore. *Clin Infec Dis* 43: 1596–1602.
- STIRLING, J.; GRIFFITH, M.; DOOLEY, J.; GOLDSMITH, C.; LOUGHREY, A.; LOWERY, C.; MCCLURG, R.; MCCORRY, K.; MCDOWELL, D.; MCMAHON, A.; MILLAR, C.; RAO, J.; ROONEY, P.; SNELLING, W.; MATSUDA, M.; MOORE, J.** 2007a. Zoonoses Associated with Petting Farms and Open Zoos. *Vector-Borne Zoonot* 8 (1): 85-92.
- STIRLING, J.; GRIFFITH, M.; BLAIR, I.; CORMICAN, M.; DOOLEY, J.; GOLDSMITH, C.; GLOVER, S.; LOUGHREY, A.; LOWERY, C.; MATSUDA, M.; McCLURG, R.; McCORRY, K.; McDOWELL, D.; McMAHON, A.** 2007b. Prevalence of Gastrointestinal Bacterial Pathogens in a Population of Zoo Animals. *Zoonoses Public Hlth* 55 (3): 166-172.
- SYNGE, B.** 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a Veterinary View. *J Appl Microbiol* (suplemento de simposio) 88: 31-37.
- VIDAL M., KRUGER E., DURAN C., LAGOS R., LEVINE M., PRADO V., TORO C. Y VIDAL R.** 2005. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrhegenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *J Clin Microbiol.* 43 (10): 5362-5365

- WANG, Y.; HE, T.; HAN, J.; WANG, J.; FOLEY, S.; YANG, Y.; WAN, S.; SHEN, J.; WU, C.** 2012. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in Fecal *Escherichia coli* Isolated from the non-human Primates in six zoos in China. *Vet Microbiol* 159: 53-59.
- WASTESON, Y.** 2001. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Vet Scand* 95: 79-64.

ANEXO 1

Animales a Muestrear

Clase	Nº total animal por clase	Orden	Nº total animal por orden	Nombre común	Nombre científico	Nº total animal por especie	
Mammalia	185	Carnivora	60	Lobo de Crin	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	10	
				Quique	<i>Galactis cuja</i>	1	
				Mofeta	<i>Mephitis mephitis</i>	7	
				Suricata	<i>Suricata suricatta</i>	8	
				Lobo Europeo	<i>Canis lupus</i>	4	
				Gineta	<i>Genetta genetta</i>	5	
				Zorro Culpeo	<i>Pseudalopex culpaeus</i>	7	
				León	<i>Panthera leo</i>	1	
				Mapache	<i>Procyon lotor</i>	5	
				Puma	<i>Felis concolor</i>	1	
				Tigre	<i>Panthera tigris</i>	2	
		Primate	30		Mono Araña	<i>Ateles geoffroyi</i>	4
					Mono Aullador	<i>Alouatta caraya</i>	5
					Mono Barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	1
					Lemur Cola Anillada	<i>Lemur catta</i>	2
					Mono Colobo	<i>Colobus guereza</i>	2
					Mono Papión	<i>Papio hamadryas</i>	7
					Mono Cai Común	<i>Cebus apella</i>	10
		Ungulata	95		Gacela de Thomson	<i>Eudorcas thomsonii</i>	14
Tapir	<i>Tapirus terrestris</i>				4		

				Antflope Sitatunga	<i>Tragelaphus spekii</i>	1
				Pudú	<i>Pudu pudu</i>	1
				Antflope Nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	3
				Jabalí	<i>Sus scrofa</i>	12
				Ciervo Dama	<i>Dama dama</i>	12
				Ciervo Rojo	<i>Cervus elaphus</i>	4
				Muflón	<i>Ovis orientalis musimon</i>	21
				Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	15
				Guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	3
				Llama	<i>Lama glama</i>	5
				Capibara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1
				Cebra Común	<i>Equus burchellii</i>	1
				Oveja Somalí	<i>Ovis ammonaries</i>	9
				Oveja Doméstica	<i>Ovis aries</i>	11
Aves	115	<i>Pelecaniformes</i>	3	Pelícano Pardo	<i>Pelecanus thagus</i>	7
				Pelícano Africano	<i>Pelecanus rufescens</i>	2
		<i>Charadriiformes</i>	5	Gaviota Dominicana	<i>Larus Dominicanus</i>	4
				Gaviota Andina	<i>Larus serranus</i>	1
		<i>Anseniformes</i>	107	Cisne Cuello Negro	<i>Cygnu smelancoryphus</i>	9
				Cisne Coscoroba	<i>Coscoroba coscoroba</i>	13
				Caiquén	<i>Chloephaga picta</i>	6
				Barnacla Cuello Rojo	<i>Branta ruficollis</i>	4
				Canquén Colorado	<i>Chloephaga rubidiceps</i>	4
				Canquén	<i>Chloephaga poliocephala</i>	2
				Pato Pintail	<i>Aythya acuta</i>	1
				Pato Carolina	<i>Aix sponsa</i>	8
				Pato Espejo	<i>Callonetta leucophrys</i>	4
				Pato Negro	<i>Cairina moschata</i>	3
		Pato Jergón	<i>Anas georgica</i>	3		
Pato Gargantilla	<i>Anas bahamensis</i>	3				

			Pato Silbón	<i>Anas penelope</i>	1
			Pato Real Chileno	<i>Anas sibilatrix</i>	2
			Ganso Monja	<i>Branta leucopsis</i>	4
			Pato Cuchara Australiano	<i>Anas rhynchotis</i>	2
			Pato Porrón Pardo	<i>Aythya nyroca</i>	5
			Pato Porrón Bastardo	<i>Aythya marila</i>	5
			Pato Mandarín	<i>Aix galericulata</i>	2
			Ganso Índico	<i>Anser indicus</i>	2
			Pato Falcata	<i>Anas falcata</i>	1
			Cisne Negro	<i>Cygnus atratus</i>	1
			Cisne Mudo	<i>Cygnus olor</i>	4
			Pato Chestnut	<i>Anas castanea</i>	3
			Pato Porrón Australiano	<i>Aythya australis</i>	9
			Pato Tardona	<i>Tadorna cana</i>	6
Total			326		

ANEXO 2

Cronograma de Actividades

	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Escritura Proyecto	■	■	■	■												
Defensa Proyecto				■												
Toma de Muestras					■	■	■	■	■	■	■	■				
Entrenamiento en el Laboratorio	■	■	■	■												
Procesamiento de Muestras					■	■	■	■	■	■	■	■				
Análisis de Resultados											■	■				
Escritura de Informe de Avance													■	■		
Entrega de Informe de Avance														■		
Escritura de Informe Final															■	■
Entrega de Informe Final																■

ANEXO 3

	Animales Muestreados	Animales Positivos	stx1	stx2	stx 1 stx2	eae	% Positivos STEC
Total	326	14	6	0	8	0	4,29
Aves	122	0	-	-	-	-	0,00
Mamíferos	203	14	6	0	8	0	6,90
<i>Eudorcas Thomsonii</i>	14	2	2	0	0	0	14,29
<i>Dama dama</i>	12	7	4	0	3	0	58,33
<i>Ovis Orientalis musimon</i>	21	3	0	0	3	0	14,29
<i>Lama glama</i>	5	1	0	0	1	0	20,00
<i>Lama guanicoe</i>	3	1	0	0	1	0	33,33

ANEXO 4

Animal	PCR Pool	PCR Colonias				
		1	2	3	4	5
<i>Eudorcas Thomsonii</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>
<i>Eudorcas Thomsonii</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	-	<i>stx1</i>	-
<i>Dama dama</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx2</i>	-	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx2</i>	-	<i>stx2</i>	-	<i>stx1 stx2</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	-	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>
<i>Dama dama</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>
<i>Lama glama</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	-	-	<i>stx1 stx2</i>
<i>Lama guanicoe</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1 stx2</i>
<i>Ovis Orientalis musimon</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	-	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>
<i>Ovis Orientalis musimon</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	-	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>
<i>Ovis Orientalis musimon</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1 stx2</i>	-