



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO LONGITUDINAL DE EXCRECIÓN FECAL DE
CAMPYLOBACTER SPP. EN MAJADAS DE OVINOS DE CRÍA**

VIRGINIA MARGARITA SANGUINETTI ELIZONDO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO LONGITUDINAL DE EXCRECIÓN FECAL DE
CAMPYLOBACTER SPP. EN MAJADAS DE OVINOS DE CRÍA**

VIRGINIA MARGARITA SANGUINETTI ELIZONDO

LUCÍA CALLEROS

Director de Tesis

FEDERICO GIANNITTI

Co-director

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Andrés D. Gil; DV, MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Laura Betancor; Lic MS, PhD
Facultad de Medicina
Universidad de la República – Uruguay

María Laura Chiapparrone; DV, PhD
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de
Buenos Aires - Argentina



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: PLATAFORMA ZOOM, martes 21/12/21

TRIBUNAL: Andrés Gil, Laura Betancor, Maria Laura Chiapparrone

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4367562-2	SANGUINETTI ELIZONDO,VIRGINIA MARGARITA	S.S.S.	12

TRIBUNAL

FIRMA

Laura Betancor

María Laura Chiapparrone

Andrés D. Gil

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

AGRADECIMIENTOS

- Tutores y familia
- Dr. Martin Fraga (INIA)
- Dra. Laura Casaux (INIA)
- Grupo Genética de microorganismos (Facultad de Ciencias)
- Lic. Maila Barcellos
- Dr. Sergio Fierro (SUL)
- Per. Agrop. Haroldo Deschenaux (SUL)

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Producción ovina nacional y su importancia económica	3
2.2 Especies de <i>Campylobacter</i>	4
2.3 <i>Campylobacter</i> spp. intestinales en rumiantes y su impacto en la salud pública	5
2.3.1 Epidemiología y transmisión de campilobacteriosis causantes de pérdidas reproductivas en ovinos.....	6
2.4 Pérdidas reproductivas ovinas en Uruguay	7
2.5 Identificación de <i>Campylobacter</i> y análisis moleculares para su detección.....	8
2.6 Factores asociados a excreción de <i>Campylobacter</i> , concepto de chance (odds) y de razón de posibilidades (OR).	9
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos específicos.....	12
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Descripción de predios, conformación de grupos y protocolo de muestreo a campo.....	16
Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. a nivel de dos predios independientes.....	16
6.2 Procesamiento de muestras en el laboratorio	19
6.2.1 Estandarización de metodologías: toma de muestra y métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas	19
6.2.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. a nivel de dos predios independientes.....	20
6.2.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de <i>Campylobacter</i> spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas	22
6.3 Análisis estadístico de proporciones y patrones de excreción	23
6.3.1 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. a nivel de dos predios independientes.....	23

6.3.2 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de <i>Campylobacter</i> spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas	23
7. RESULTADOS	25
7.1 Toma de muestra, métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas y estandarización de metodologías	25
7.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. a nivel de establecimientos rurales.....	26
7.2.1 Extracciones de ADN de las muestras de campo de los predios 1a y 1b, contaminaciones de materia fecal con diluciones seriadas de <i>C. jejuni</i> y control de extracción	26
7.2.2 Recuento en placa de contaminaciones artificiales y qPCR para detección de <i>C. jejuni</i>	29
7.2.3 PCR para detección de especies de <i>Campylobacter</i>	33
7.2.4 Purificación de productos de PCR para detección de <i>Campylobacter</i> spp. y secuenciación.....	35
7.2.5 Análisis estadístico de proporciones y cálculo muestral	36
7.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de <i>Campylobacter</i> spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas	37
7.3.1 Aptitud reproductiva aparente, conformación de grupos en cada establecimiento y servicio.....	37
7.3.2 Muestreo fecal, ecografía y condición corporal	37
7.3.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio	41
7.3.4 Análisis estadístico de proporciones de animales con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. de acuerdo con los tiempos de muestreo según el predio, la categoría y otros factores asociados	42
8. DISCUSIÓN	61
8.1 Toma de muestra, métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas y estandarización de metodologías	61
8.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría con presencia de <i>Campylobacter</i> spp. a nivel de predios	63
8.2.1 Extracciones de ADN para muestras de campo en los predios 1a y 1b, contaminaciones de materia fecal con diluciones seriadas de <i>C. jejuni</i> y control de extracción	63
8.2.2 qPCR para la detección de <i>C. jejuni</i>	65
8.2.3 PCR para detección de especies de <i>Campylobacter</i>	68
8.2.4 Purificación de productos de PCR y secuenciación.....	69
8.2.5 Análisis estadístico de proporciones y cálculo muestral	70

8.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de <i>Campylobacter</i> spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas	72
8.3.1 Aptitud reproductiva aparente, conformación de grupos en cada establecimiento y servicio.....	72
8.3.2 Muestreo fecal, ecografía y condición corporal	72
8.3.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio	74
8.3.4 Patrones de excreción de <i>Campylobacter</i> spp.	74
8.3.5 Análisis de factores asociados a excreción de <i>Campylobacter</i> en el contexto del diseño experimental	76
9. CONCLUSIONES.....	87
10. PERSPECTIVAS	89
11. REFERENCIAS	90
ANEXOS	104

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Estrategia de investigación. Se presenta la estrategia adoptada, que consta de dos etapas.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al utilizar los cebadores que amplifican el gen *16S* de ARNr de bacterias y archaeas.

Figura 3. Gráficos de regresión lineal para cálculo de la eficiencia de qPCR para *C. jejuni*.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % al utilizar los cebadores que amplifican el gen *16S* de *Campylobacter* spp. en las muestras codificadas P01-P22.

Figura 5. Cromatograma de la secuencia para la muestra kit-1j (muestra fecal contaminada con la dilución -1 de la suspensión de la cepa M3 de *C. jejuni*, extracción realizada con el kit *ZYMO*).

Figura 6. Identidad nucleotídica de la secuencia de la muestra P07 con secuencias de la base de datos.

Figura 7. Representación gráfica de tiempos de muestreo con fechas de toma de muestra, determinación de condición corporal y de ecografía.

Figura 8. Condición corporal por categorías y predios para muestreo longitudinal.

Figura 9. Días de gestación en el predio 2a a los T₂, T₃ y T₄. Figura 10. Días de gestación en el predio 2b a los T₂, T₃ y T₄.

Figura 11. Muestras analizadas para detección de *Campylobacter* spp. en todos los muestreos de los predios 2a y 2b.

Figura 12. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* spp. por tiempo de muestreo en predio 2a.

Figura 13. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* spp. por tiempo de muestreo en el predio 2b.

Figura 14. Proporciones de borregas excretando *Campylobacter* spp. en los predios 2a y 2b.

Figura 15. Proporciones de ovejas excretando *Campylobacter* spp. en los predios 2a y 2b.

Figura 16. Número de individuos con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 muestras con presencia de *Campylobacter* spp. en ambos predios

Figura 17. Log odds simulados a partir de la ecuación del modelo de regresión para T₀.

Figura 18. Log odds simulados a partir de la ecuación del modelo de regresión para T₂.

Figura 19. Evidencia de efecto de modificación entre categoría y el predio en T₃.

Figura 20. Log odds simulados a partir de la ecuación del modelo de regresión para T₃.

Figura 21. Evidencia de interacción entre predio y la gestación en T₄.

Figura 22. Log odds simulados a partir de la ecuación del modelo de regresión para T₄.

Figura 23. Diagrama de factores permanentes y que cambiaron en el tiempo por predio y picos de máxima excreción de *Campylobacter*.

TABLAS

Tabla 1. Resultados de PCR para 16S ARNr de archaeas y bacterias, de *Campylobacter* spp. y qPCR para *C. jejuni* en muestras del predio 1a (borregas)

Tabla 2. Resultados de PCR para 16S ARNr de archaeas y bacterias, de *Campylobacter* spp. y qPCR para *C. jejuni* en muestras del predio 1b (ovejas)

Tabla 3. Resultados de la qPCR para detección de *C. jejuni* en muestras fecales contaminadas con diluciones de la cepa M3 de *C. jejuni*

Tabla 4. Resultados de PCR para detección de 16S de *Campylobacter*

Tabla 5. Condición corporal promedio por cada tiempo de muestreo en los predios 2a y 2b

Tabla 6. Excreción de *Campylobacter* spp. en el predio 2a

Tabla 7. Detalle de categorías de animales con detección de *Campylobacter* en un solo muestreo en el predio 2a

Tabla 8. Excreción de *Campylobacter* spp. en el predio 2b

Tabla 9. Detalle de categorías de animales con detección de *Campylobacter* en un solo muestreo en el predio 2b

Tabla 10. Coeficientes para T_0 resultantes del modelo de regresión

Tabla 11. Coeficientes para T_2 resultantes del modelo de regresión

Tabla 12. Coeficientes para T_3 resultantes del modelo de regresión

Tabla 13. Coeficientes para T_4 resultantes del modelo de regresión

ANEXOS

ANEXO A. Métodos de extracción de ADN

ANEXO B. Cebadores y condiciones de reacción de PCR para la identificación del gen *16S* de bacterias y archaeas en general

ANEXO C. Protocolo de extracción de ADN con el kit *ZYMO Miniprep fecal/soil*

ANEXO D. Cebadores y condiciones de reacción de qPCR para la identificación del gen *hipOa* de *Campylobacter jejuni*

ANEXO E. Cebadores y condiciones de reacción de PCR para la identificación del gen *16S* de *Campylobacter*

ANEXO F. Protocolos de purificación de ADN

ANEXO G. Cuantificación de ácidos nucleicos de contaminaciones fecales con la cepa M3 por dos métodos de extracción

ANEXO H. Categoría y datos reproductivos de los predios 2a y 2b

ANEXO I. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* por predio y por categoría en los distintos tiempos

ANEXO J. Detalles modelos de regresión construidos a partir de modelos saturados

ABREVIATURAS

ΔC_t : diferencia en C_t

2D: 2 dientes

6D: 6 dientes

8D: 8 dientes

16S: ARN ribosomal 16S

ARA: aptitud reproductiva aparente

B: borrega

CeuE: transportadores de sideróforos

CC: condición corporal

cstA: “carbon starvation protein”

c.s.p.: cantidad suficiente para

Fb: *fast boiling*

GCe; gonadotropina coriónica equina

hipO: gen hipuricasa

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

logit: log de las chances

LOD: límite inferior de detección

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz

mapA: lipoproteína de membrana *mapA*

n= tamaño de muestra por grupo

N= tamaño de muestra total

NA: no analizado

O: oveja

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

OR: odds ratio (razón de posibilidades)

pb: pares de bases

PBS: solución tampón fosfato salino

TAE: solución tampón Tris-EDTA

UI: unidades internacionales

virB11: proteína de secreción tipo IV

RESUMEN

La producción ovina ha sido fundamental en el desarrollo socioeconómico de Uruguay. Los sistemas pecuarios han tendido a la intensificación y esto podría ocasionar nuevas problemáticas que debemos monitorear para mitigar sus eventuales efectos. Dentro de las especies pertenecientes a la microbiota intestinal que han cobrado importancia, se encuentran las de *Campylobacter*. Estas han sido identificadas como responsables de gastroenteritis en humanos, y también como importantes causantes de aborto en ovinos. A nivel de establecimientos, la proporción de animales que excretan estas bacterias varía ampliamente entre majadas, especies animales, estudios y sitios de muestreo. Es importante contar con métodos que rápidamente puedan identificar animales que posean altas cargas de estos agentes, para tomar medidas preventivas y de control, evitando consecuencias reproductivas y de salud pública. El objetivo principal fue describir la excreción de *Campylobacter* spp. en borregas y ovejas de cría de majadas de Uruguay a lo largo del ciclo reproductivo en el año 2020, y evaluar factores asociados definidos a priori para la excreción de *Campylobacter* spp. en cada tiempo de muestreo. A partir de un diseño longitudinal de 20 borregas y 19 ovejas en el predio 2a y 19 ovejas y 18 borregas en el predio 2b, se monitoreó la excreción fecal de *Campylobacter* spp. utilizando técnicas moleculares para detección de especies de *Campylobacter* y específicamente de *Campylobacter jejuni*. Se observaron diferencias en las proporciones de animales excretores de *Campylobacter* spp. a lo largo del tiempo según la categoría y el predio, sin encontrarse excretores de *C. jejuni*. Los factores principales para explicar la excreción considerados en este ensayo fueron la categoría (borrega/oveja) y los días de gestación en el muestreo T₄. En el predio 2b, la proporción de ovejas excretando *Campylobacter* spp. fue máxima (0.80) próximo al parto, similarmente a lo que determinaron otros estudios. Por otra parte, la máxima excreción de *Campylobacter* spp. en las borregas y ovejas del predio 2a y borregas del predio 2b coincidieron con eventos puntuales: la esquila preparto y el cambio de plano nutricional. Se secuenciaron amplicones al azar y 11 muestras tuvieron alta identidad con *C. lanienae*, una especie comensal en animales y que recientemente se ha asociado a casos clínicos de gastroenteritis en humanos. No se identificaron especies con conocida patogenicidad para ovinos.

Estos resultados indican que la proporción de ovinos que excretan *C. lanienae* es variable a lo largo del ciclo reproductivo. El monitoreo longitudinal empleando técnicas moleculares de detección, permite conocer los cambios que ocurren en la excreción del agente en los huéspedes, y podría ser de utilidad para monitorear la eliminación de *Campylobacter* spp. en majadas padeciendo pérdidas reproductivas para mejorar el entendimiento de la epidemiología y transmisión de *Campylobacter* spp., incluyendo aquellas responsables de campilobacteriosis ovina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Producción ovina nacional y su importancia económica

La producción ovina ha sido de gran importancia en la historia del desarrollo económico y social de Uruguay. Durante mucho tiempo fue el principal rubro proveedor de divisas del país y jugó un papel fundamental en el aprovisionamiento de materia prima permitiendo el desarrollo de la industria textil nacional, así como obtener una de las principales fuentes alimenticias en el desarrollo rural. Las existencias ovinas sufrieron una drástica disminución luego de 1991, cuando la estructura de la majada nacional pasó de un sistema lanero con producción de capones a un sistema puramente de cría y producción de corderos pesados, ocurriendo una concentración en las zonas de basalto (SUL, 2018). Tradicionalmente los productores uruguayos se han inclinado por razas de doble propósito (carne y lana), cuyo potencial reproductivo es limitado y está condicionado por la edad a la primera encarnerada y el potencial de mellizos. Existen varios factores que incidieron negativamente, y lo están haciendo actualmente, entre los cuales se destacan: los predadores, las condiciones climáticas, la falta de mano de obra y el endeudamiento (INIA, 2005).

Dado el contexto actual, se ha incorporado gradualmente una serie de tecnologías que han demostrado ser efectivas en mejorar el porcentaje de señalada. En primer lugar, el empleo de la ecografía para mejorar el plano nutricional de las hembras melliceras, la suplementación de último tercio de la gestación de la majada de cría y la esquila preparto (Banchero et al., 2007).

Más recientemente se ha hecho hincapié en el incremento de las precauciones para el resguardo de inclemencias climáticas al momento de la parición (índice de enfriamiento) utilizando parideras, el aumento de la tasa ovulatoria empleando cruzamientos con razas prolíficas y el uso de perros de guarda para reducir la depredación (Ganzábal et al., 2007; Ganzábal, 2018; Grattarola, 2013).

En la actualidad las existencias ovinas en el país son de 6,6-7 millones de cabezas. En el total del comercio mundial, Uruguay da cuenta del 1,2% del mercado de lanas y el 9% del mercado de lana peinada. Cabe destacar que nuestro país es el cuarto exportador con

destino a China (Bertamini & Bervejillo, 2015). La señalada nacional de corderos se estima en 75%. Últimamente han surgido productores ovinos familiares de pequeña escala en la zona sur del país. No es esperable que la pequeña escala produzca cambios macroeconómicos importantes, pero genera evoluciones en el capital social, cuantificables a través de la colaboración establecida en un grupo humano, y el uso individual o familiar de las oportunidades surgidas a partir de ellas. En estos sistemas de producción la precocidad sexual, los partos múltiples y los ciclos biológicos cortos son fundamentales. Es así que se explica la introducción de las razas Finnish Landrace y Frisona Milchschaaf (Banchero & Rivero, 2017; CYTED, 2014).

Debido a los cambios que están sucediendo propios de la intensificación, es fundamental el monitoreo de agentes patógenos que son plausibles de desencadenar problemáticas antes no reconocidas o dimensionadas. Dentro de los agentes a destacar, se encuentran las especies del género *Campylobacter*, que forman parte de la microbiota intestinal de rumiantes y algunas de las cuales pueden causar importantes pérdidas reproductivas en ovinos (Rukambile et al., 2019).

2.2 Especies de *Campylobacter*

La primera bacteria perteneciente al género que hoy se conoce como *Campylobacter* fue aislada en 1906 por McFadyean y Stockman en el Reino Unido. Estos investigadores observaron un microorganismo muy móvil y con forma curvada en una muestra de mucus uterino de una oveja preñada de un rebaño con alto porcentaje de abortos. Esta bacteria fue también aislada en Estados Unidos por Smith y Taylor en 1919 y nombrada *Vibrio fetus*, debido a su semejanza morfológica y de motilidad con ejemplares del género *Vibrio*. En 1963, Sébald y Véron propusieron que las especies *Vibrio fetus* y *Vibrio bubulus* debían incluirse en un nuevo género debido a sus diferencias en el contenido de bases GC (guanina citosina) y en la prueba de oxidación-fermentación (prueba de Hugh y Leifson) con respecto a otras especies del género *Vibrio*. Este nuevo género fue llamado *Campylobacter* (del griego *campy*, que significa “curvo”) debido a su forma (Sébald & Véron, 1963). En 1973 Véron y Chatelain realizaron un estudio taxonómico del género *Campylobacter* en base a pruebas bioquímicas, serológicas y contenido GC abarcando en el mismo cuatro especies: *C. fetus* (con las subespecies *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis*), *C. jejuni*, *C. coli* y *C. sputorum* (Skirrow, 2006).

Actualmente, el género *Campylobacter* comprende 33 especies y seis subespecies (Vandamme & Ley, 1991; LPSN, 2021). Dentro de las 33 especies hay especies comensales y patógenas que habitan en un amplio rango de hospederos.

2.3 *Campylobacter* spp. intestinales en rumiantes y su impacto en la salud pública

Por ser causante de infecciones humanas en varios países, se han realizado numerosos estudios de *C. jejuni* y su colonización en el tracto gastrointestinal, encontrándose en una amplia variedad de animales homeotermos (Skirrow, 2006; Stanley & Jones 2003; OIE 2018). Clásicamente se consideró a las aves como principales responsables de la transmisión de infecciones clínicas por *C. jejuni* en humanos. Sin embargo, existe evidencia molecular que sugiere que hay una importante influencia de fuentes de contaminación diferentes a las aves para casos humanos, siendo las mismas subestimadas (Stanley & Jones, 2003). En Uruguay se han reportado casos de gastroenteritis causados por *Campylobacter* spp. en niños con cuadros de diarrea sanguinolenta (Mota et al., 2010; Notejane et al., 2015). No se identifica en estas publicaciones las especies involucradas en los casos. También existe un reporte de caso en un trabajador rural asociado a *C. fetus* (Iraola et al., 2015).

La contribución directa o indirecta de los rumiantes en la transmisión de *C. jejuni* a humanos en casos esporádicos es desconocida (Stanley & Jones, 2003). Existe poca evidencia a partir de estudios de casos y controles o de prevalencia que sugieren que el consumo de carnes rojas es un importante factor de riesgo para las infecciones humanas. En los últimos años se ha concluido que la proporción de *Campylobacter* spp. en carnes rojas es baja con respecto a la encontrada en carne de pollo. Sin embargo, existe evidencia molecular de que las fuentes no aviares de contaminación son importantes para las infecciones clínicas en humanos (Fitzgerald et al., 2001; Nielsen et al., 2000; On, 1996; Stanley & Jones, 2003). En un estudio realizado en Reino Unido, se encontró que algunas cepas parecían ser específicas de huésped y que seis genotipos diferentes componían el 50% de las cepas aisladas de materia fecal en bovinos, ovinos y pavos sanos. Estas mismas cepas se encontraban en muestras de humanos (Fitzgerald et al., 2001). Por lo tanto, estos huéspedes pueden excretar cepas capaces de causar enfermedad clínica en humanos, y que la estacionalidad que presentan puede deberse a diferencias importantes

en la ecología de los reservorios del agente (Grove-White et al., 2010; Stanley & Jones, 2003).

En el caso de especies termofílicas como *C. coli* y *C. jejuni* el mayor reservorio natural son los intestinos de mamíferos y aves (OIE, 2018; Stanley & Jones, 2003). Por lo general, no son patogénicas en animales adultos y la colonización y tasas de portador son mayores en animales más jóvenes. Existe estacionalidad en el estado de portador en animales adultos (Griffiths & Park, 1990; Grove-White et al., 2010; Rukambile et al., 2019).

2.3.1 Epidemiología y transmisión de campilobacteriosis causantes de pérdidas reproductivas en ovinos

Las especies de *Campylobacter* causantes de abortos en ovinos son altamente contagiosas (Hedstrom et al., 1987; Wu et al., 2014) y pertenecen a la población normal del intestino de varias especies animales. Algunas especies animales, incluyendo ovinos, bovinos, cerdos y aves, son reservorios de las mismas y las eliminan por heces, de modo que las bacterias se encuentran en el ambiente, incluyendo tierra y aguas residuales y subterráneas (Ogden et al., 2009). Las bacterias ayudadas por su flagelo son capaces de colonizar el intestino (Stahl & Vallance, 2015) y asentarse compitiendo en desventaja con otros microorganismos. Se cree que los ovinos portadores son en gran parte responsables por los brotes de enfermedad en las majadas, cuando los mismos son manejados en altas cargas por unidad de superficie (Stanley & Jones, 2003). La transmisión se realiza mediante ingestión de alimento o agua contaminados, material de aborto y descargas uterinas. No existe transmisión sexual ni infertilidad. El aborto suele ocurrir 7-25 días luego de la infección, típicamente ocurriendo en el último periodo de la gestación (APHIS, 2014; Glanville, 2017; Wu et al., 2014).

Usualmente la incidencia de abortos por campilobacteriosis es 10-20%, pero en algunos brotes pueden llegar a abortar la mitad de las hembras (Wu et al., 2014). Se desarrolla inmunidad en las hembras abortadas y mediante contacto con otras hembras infectadas dentro de una majada. La mayoría de las hembras recuperan la capacidad de reproducirse en años subsiguientes. Sin embargo, las ovejas portadoras pueden ser fuente

de infección para animales susceptibles no expuestos, ya que se convierten en eliminadoras fecales persistentes de *Campylobacter* spp. (APHIS, 2014; Wu et al., 2014). La asociación entre la presencia de la bacteria en el tracto intestinal y aborto aún no está clara (Hum et al., 2009; APHIS, 2014; Sanad et al., 2014).

En Nueva Zelanda y Australia, *C. fetus* es la causa principal de aborto infeccioso ovino, aunque las especies *C. jejuni* y *C. coli* también han sido implicadas (Mannering et al., 2006). En Brasil la ocurrencia de estas bacterias y la asociación con problemas reproductivos es baja. En un estudio de la materia fecal de ovejas sanas se obtuvo un 2,9% de positivas para *C. jejuni* (Rizzo et al., 2015). En Argentina se reportó a *C. fetus fetus* en un brote de aborto en un tambo de ovinos Pampinta en La Pampa, con aislamiento de muestras fetales y de placenta (Fiorentino et al., 2015). En el mismo país, *C. jejuni* fue identificada como causa de placentitis y aborto en una oveja (Della Rosa, 2021). En Uruguay, *C. fetus fetus* fue confirmada como causal de aborto en una oveja (Dorsch et al., 2021), y una cepa de *Campylobacter* no identificada definitivamente a nivel de especie, pero distinta de *C. fetus* (posiblemente *C. jejuni*), se asoció también a aborto ovino (Aráoz et al., 2018; Dorsch et al., 2021b). El Centro de Epidemiología y Salud Animal de Estados Unidos determinó que desde 1980 ocurrió un cambio en la predominancia de *C. fetus* a *C. jejuni* en abortos ovinos. Un clon particular de *C. jejuni* denominado SA predomina y tiene un alto grado de resistencia a tetraciclinas, reafirmando la importancia de la vigilancia de este patógeno (APHIS, 2014; Sahin et al., 2017; Wu et al., 2014). Es importante contar con métodos que rápidamente puedan identificar animales que posean altas cargas de *Campylobacter* spp. y su identificación a nivel de especies de modo de poder tomar medidas de prevención y control y evitar su transmisión dentro y entre majadas.

2.4 Pérdidas reproductivas ovinas en Uruguay

Las pérdidas reproductivas han sido poco estudiadas y cuantificadas a nivel nacional en el pasado, donde las pérdidas embrionarias, que representan un 15-30%, las fetales, que son 5-7% y la sobrevida de los corderos hasta las 72 h de nacidos representan los puntos críticos. La tasa de fertilización varía entre un 75 y un 94%, siendo dependientes de factores como la alimentación y la sanidad. Las muertes embrionarias se

pueden dividir en precoces y tardías, siendo las precoces las de mayor importancia. La condición corporal es un factor determinante de las mismas (Fernández Abella, 2011).

Recientemente se publicaron tres reportes de casos de abortos ocasionados por *Campylobacter* spp. en Uruguay. El primer caso correspondía a una oveja de dos años cruza Texel con Ideal de una majada de 23 ovinos en el departamento de Colonia, que abortó un feto a término con lesiones típicas de campilobacteriosis. Aunque la especie actuante no pudo ser identificada con certeza, la secuenciación de un fragmento del gen 16S RNA reveló que no se trataba de *C. fetus*, sino que tenía 99-100% de similitud con las siguientes cuatro especies: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. insulaenigrae* y *C. hepaticus* (Araóz et al., 2018). De estas especies, la única con potencial patogénico y abortivo ampliamente reconocido es *C. jejuni*. En el segundo caso, se aisló *C. fetus fetus* a partir de una placenta de una oveja de la raza Finnish abortada en el mismo departamento, y que tenía severa placentitis (Giannitti et al., 2018). Interesantemente la cepa aislada demostró ser multirresistente a antibióticos (Dorsch et al., 2021a), por lo que fue sometida a secuenciación del genoma completo (Costa et al., 2020). En 2020 se registró un brote de abortos ovinos por *C. fetus fetus* en una majada del departamento de Río Negro (Giannitti F, comunicación personal).

2.5 Identificación de *Campylobacter* y análisis moleculares para su detección

Las técnicas de diagnóstico recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para *Campylobacter* son cultivo y aislamiento bacteriano y espectrometría de masas por MALDI-TOF. Estas técnicas se recomiendan para garantizar que la población se encuentre libre del agente patógeno, para contribuir en políticas de erradicación y en vigilancia epidemiológica (OIE, 2018). La detección de patógenos dependientes del aislamiento combinado con la identificación bioquímica, si bien es altamente específica, requiere de tiempo y personal capacitado. Para *Campylobacter* estas técnicas se ven afectadas por la labilidad de la bacteria (dificultad para sobrevivir al transporte hasta el laboratorio debida a su sensibilidad al oxígeno), su crecimiento lento en placas de cultivo (de 5 a 7 días) y la competencia de la bacteria con otras presentes en el medio (Barcellos, 2018; Calleros, 2015; Delpiazzo et al., 2021). La caracterización bioquímica puede complementarse o sustituirse por métodos moleculares o MALDI-TOF. Se establece por la OIE que las técnicas moleculares por sí solas son adecuadas,

pero se requiere continuar validándolas (OIE, 2018). Se han diseñado varias técnicas de PCR que logran identificar especies o grupos de especies de *Campylobacter* (Bang et al., 2001). La metodología propuesta por Linton et al. (1996) es ampliamente utilizada para la detección e identificación de especies del género *Campylobacter*. La misma consiste en una PCR a tiempo final cuyo blanco de amplificación es el gen *16S* ribosomal (Linton et al., 1996). En los métodos moleculares de detección deben incluirse cepas de referencia positivas y controles negativos para detectar posibles inhibiciones de la PCR por la matriz de la muestra. Mediante secuenciación directa de los amplicones obtenidos se puede caracterizar la especie mayoritaria (Barcellos, 2018; Gorkiewicz et al., 2003; OIE, 2018).

Las técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR), permiten una detección rápida, igual de específica que los métodos de cultivo, y han demostrado ser más sensibles (Calleros, 2015; Delpiazzi et al., 2021; Iraola et al., 2016). Estas están basadas en distintas sondas de ADN y en amplificación de fragmentos blanco-específicos. Vondrakova y col. diseñaron y pusieron a punto una PCR múltiple a tiempo real para mejorar la detección y cuantificación simultánea de *C. jejuni*, *C. lari* y *C. coli* a partir de muestras alimenticias. Diseñaron cebadores y sondas de hidrólisis para el gen *hipO* (hipuricasa) de *C. jejuni*, serina hidroximetiltransferasa de *C. coli* y peptidasa T de *C. lari* (Vondrakova et al., 2014). Otro diseño de qPCR doble, amplifica un fragmento del gen *mapA* de *C. jejuni*, y del gen *CeuE* de *C. coli* (Best et al., 2003).

2.6 Factores asociados a excreción de *Campylobacter*, concepto de chance (odds) y de razón de posibilidades (OR).

Es de suma importancia estudiar los factores que afectan la excreción de microorganismos causantes de enfermedades zoonóticas. Los animales de producción constituyen importantes reservorios de estos microorganismos y su monitoreo es fundamental para garantizar que no sean una amenaza para la salud pública (OIE, 2018; Rukambile et al., 2019; Stanley & Jones, 2003). Se han identificado algunas variables como: tamaño del rebaño, época del año, edad del animal, características del predio, dieta, prácticas de estabulación, el parto y el destete, como explicativas de las diferencias observadas entre estudios (Grove-White et al., 2010; Kimman et al., 2013; Stanley &

Jones, 2003). Una de las formas de evaluar el OR es a través de modelos de regresión (Glen, 2021).

- La chance (*odds*) se define como la razón de éxito sobre la razón de fracaso. Su rango es $[0, \infty]$.

$$Odds = P/(1 - P) \quad (A)$$

- La razón de posibilidades (OR) es una medida de asociación entre exposición y ocurrencia de un acontecimiento. La razón representa la chance de que suceda algo dada una exposición particular en comparación con falta de exposición. Puede ser empleado para determinar si la exposición a una determinada variable de interés constituye un factor en particular para el acontecimiento de la variable de interés y para comparar la magnitud de varios factores. Por lo general se emplean en estudios de casos y controles, pero también en estudios de cohorte y transversales. En la ecuación B se presenta la fórmula utilizada para el cálculo de OR.

$$OR = \frac{P1/(1-P1)}{P2/(1-P2)} \quad (B)$$

La interpretación del OR se realiza de la siguiente forma:

OR=1. La exposición no afecta la ocurrencia del evento de interés.

OR>1. La exposición está asociada a un aumento de chance de ocurrencia de evento de interés.

OR<1. La exposición está asociada a una menor chance de ocurrencia de evento de interés.

No se pueden emplear los OR directamente en modelos porque son asimétricos. Es por este motivo que se utiliza el log de OR (logit) que permite crear una regresión cuya relación es simétrica con respecto a 0.

Función del logaritmo natural

La regresión logística se emplea cuando se desea modelar una respuesta dicotómica. Generalmente, se codifica la respuesta con 0 y 1 (por ejemplo, 0 ausencia, 1

presencia). La media de la distribución es equivalente a la proporción de 1 en los datos. Por otra parte, la media de la población representa la probabilidad de escoger al azar de la distribución una observación cuya respuesta sea 1. Es por esta razón, que la proporción de 1 y la probabilidad son iguales en estos casos (P) y la proporción de 0 es $(1-P)$. El objetivo de la regresión logística es predecir una probabilidad desconocida para el suceso de un evento de interés. En el modelo logit (el log de *odds*, el log de la chance) de la respuesta es modelada como una combinación lineal de las variables predictoras. Al emplear una regresión logística, el coeficiente de regresión calculado representa el aumento estimado en el log de la chance de ocurrencia de un acontecimiento por cada unidad de aumento en el valor de la exposición (Szumuilas, 2010; Bhattacharyya, 2018).

Los estudios longitudinales, como el que se realizó en esta tesis, permiten monitorear una respuesta en el tiempo. Se ha estudiado en otros países que la excreción es intermitente y el parto es un factor asociado al aumento de la excreción de especies de *Campylobacter* en ovinos y que la tasa de portadores es mayor en animales jóvenes. En nuestro país los abortos por especies de *Campylobacter* significan un problema y es de suma importancia examinar cuáles son los factores que determinan una mayor excreción de estos agentes y aumentan la contaminación ambiental y de que los animales se expongan a cepas y cantidades que puedan desencadenar pérdidas reproductivas. Este estudio permite abordar un tema complejo, multifactorial en un diseño observacional que genera un conocimiento nuevo en nuestro país.

3. HIPÓTESIS

La excreción de *Campylobacter* spp. en ovinos es intermitente y la proporción de hembras eliminadoras fecales del agente varía con la categoría y momentos del ciclo productivo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir la excreción de *Campylobacter* spp. en borregas y ovejas de cría de majadas de Uruguay a lo largo del ciclo reproductivo en el año 2020, y evaluar factores asociados definidos a priori para la excreción de *Campylobacter* spp. en cada tiempo de muestreo.

4.2 Objetivos específicos

1. Comparar dos métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas para la detección de *Campylobacter* spp. mediante PCR/qPCR.
2. Evaluar el límite de detección de una qPCR para *C. jejuni* mediante contaminaciones artificiales de heces ovinas con una cepa del agente.
3. Monitorear la excreción fecal de especies de *Campylobacter* en cinco momentos de muestreo a lo largo del ciclo reproductivo en borregas y ovejas de cría y describir los patrones de excreción fecal en animales a lo largo del tiempo (intermitente o continua).
4. Determinar factores asociados a la excreción fecal de *Campylobacter* en cada tiempo de muestreo.
5. Identificar las especies de *Campylobacter* excretadas por los animales mediante secuenciación de un fragmento del gen 16S.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La estrategia de investigación consistió en dos etapas que contaron con trabajo de campo y de laboratorio (Figura 1). En la primera etapa de laboratorio se evaluaron metodologías moleculares para la identificación de *C. jejuni* a partir de muestras fecales ovinas por qPCR. La puesta a punto de esta técnica consistió en la realización de contaminaciones artificiales de materia fecal ovina con cultivos puros y diluciones seriadas de *C. jejuni*. Para verificar la integridad del ADN extraído y descartar la presencia de inhibidores, se realizó una PCR a tiempo final diseñada por Barcellos (2018) cuyo blanco es el gen *16S* de archaeas y bacterias. Dentro de la primera etapa de campo se realizó un muestreo fecal al azar de 39 borregas y 23 ovejas en dos establecimientos independientes (predio 1a y predio 1b) y se usó la metodología puesta a punto para la identificación de *C. jejuni* por qPCR. Debido a que las muestras de campo fueron negativas a *C. jejuni* se optó por realizar una PCR a tiempo final diseñada por Linton (1996) y puesta a punto en el laboratorio de Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias, UdelaR, para la detección de especies pertenecientes al género *Campylobacter*. La proporción resultante de animales con detección de bacterias pertenecientes al género al momento del muestreo en la primera etapa por categoría (borregas/ovejas) se empleó para realizar un cálculo muestral para detección de diferencias en proporciones existentes entre categorías en la segunda etapa.

La segunda etapa del trabajo consistió en un diseño longitudinal de muestreo de un número constante de animales por categoría según lo determinado en la primera etapa. Se sumó otro predio al ensayo (predio 2b) de modo de aumentar el tamaño muestral. Se muestrearon dos establecimientos independientes (predio 2a y predio 2b). En el predio 2a se incluyeron 20 borregas de 2 dientes (D) y 19 ovejas de 6 a 8 D identificadas individualmente con una caravana visual. En el predio 2b se incluyeron 19 ovejas y 18 borregas de la misma edad que las anteriores que pastaban conjuntamente la mayoría del ensayo. Las muestras fueron tomadas a lo largo del ciclo reproductivo en tiempos prefijados (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4). Se empleó la misma metodología de laboratorio que en la etapa anterior para el procesamiento de las muestras.

Se analizaron los datos obtenidos en primera instancia a través de análisis exploratorios para el estudio de variables individuales y sus características. El análisis se basó en el tiempo de muestreo y en las categorías. Se realizaron pruebas de comparación de proporciones entre categorías y se describieron los patrones de excreción de cada hembra participante. Se utilizaron modelos de regresión para evaluar los factores definidos *a priori* y su eventual asociación con la proporción de animales eliminando el agente en cada tiempo de muestreo.

Once amplicones tomados al azar fueron enviados a secuenciar para determinar la especie de *Campylobacter* presente. Se realizó la edición y ensamblado de las secuencias mediante herramientas informáticas. Se compararon entre sí y con secuencias existentes en las bases de datos.



Figura 1. Estrategia de investigación. Se presenta la estrategia adoptada, que consta de dos etapas. ARA: aptitud reproductiva aparente. T: tiempo

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción de predios, conformación de grupos y protocolo de muestreo a campo

Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de dos predios independientes

Durante 2019 se seleccionaron dos predios con sistemas de producción ovina: uno en el departamento de Flores (predio 1a) y otro en Colonia (predio 1b). El predio 1a es un predio comercial semi intensivo que no posee antecedentes de pérdidas reproductivas diagnosticadas y con buenos porcentajes de señalada histórica. Por otra parte, el predio 1b cuenta con un antecedente diagnosticado de aborto por campilobacteriosis en una oveja de dos años cruza Texel con Ideal de una majada de 23 ovinos. En esta majada se reportó en 2017 un caso de un feto abortado por *Campylobacter* spp. a término con diagnóstico confirmado por histopatología y PCR de muestras de líquido abomasal y pulmón (Aráoz et al., 2018). La secuenciación de un fragmento del gen 16S ARN (Linton et al., 1996) reveló 99-100% de similitud con *C. jejuni*, *C. coli*, *C. insulaenigrae* y *C. hepaticus*. La hembra abortada no se encontraba en el predio al momento del muestreo fecal realizado en esta tesis.

La toma de muestra se realizó mediante extracción manual de 5 boñigas de materia fecal del recto por cada animal, que se colocaron en un frasco estéril rotulado con 15 mL de suero fisiológico (solución de cloruro de sodio al 0,9%) estéril. Las muestras fueron colocadas en una conservadora refrigerada a 4-8°C para luego colocarlas a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio. El protocolo de muestreo (ID 822 "Toma de muestras de heces ovinas para la búsqueda de *Campylobacter* spp.") fue aceptado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Facultad de Ciencias) el 27/2/2019.

Se realizó un muestreo transversal y aleatorio simple de 39 borregas de 2 D en el predio 1a de una majada de 190 animales (20,5%) en agosto. En el predio 1b el muestreo correspondió al 100% de la majada de 23 ovejas de 4 D y 6 D en octubre.

Etapas 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas

Los predios usados para esta etapa están identificados como 2a y 2b. Sin embargo, el predio 2a es el mismo que el predio 1a usado en la primera etapa. Es un predio comercial y emplea un sistema mixto de pastoreo bovinos-ovinos. Los ovinos empleados son de la raza Merilín y es una majada de 220 ovejas y borregas. En este sistema se realiza un servicio extendido como estrategia para mitigar la mortandad perinatal por efectos climáticos. Se realiza inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y ecografía con clasificación de hembras melliceras para mejorar su plano nutricional. Se realiza esquila preparto y se cuenta con lugares resguardados para parición, campo natural mejorado y praderas donde pastan las hembras preñadas luego de la esquila preparto. Se realizó el mismo manejo nutricional para borregas y ovejas a lo largo del ensayo.

El predio 2b es de carácter experimental-demostrativo con pastoreo mixto bovino-ovino. La majada en estudio está compuesta por 200 ovejas y 18 borregas de 2 D. Las mismas son de la raza Corriedale PRO y fueron encarneradas con carneros Southdown durante 34 días. La majada se encontraba bajo estudio en un proyecto financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, código FCE_3_2018_1_148540, título: “Cuantificación de pérdidas embrionarias y fetales en majadas de Uruguay y diagnóstico de agentes infecciosos involucrados”). Luego del día 100 de gestación se realizó esquila preparto y se clasificaron las ovejas por gestación simple/múltiple priorizando las de gestación múltiple en praderas de mejor calidad.

Se realizó un examen de aptitud reproductiva aparente (ARA) preservicio en los dos predios a toda la majada disponible para entrar a servicio. Se revisó el estado de la dentición para determinar el estado de desgaste (y a través de esta estimar la edad), el estado de las pezuñas y la condición de las ubres. Del lote considerado apto para

reproducción en función del examen de ARA, y de acuerdo con los resultados de la etapa 1, se utilizó para el ensayo un grupo de 19 ovejas adultas y uno de 20 borregas de 2 D para el predio 2a y de 19 ovejas y 18 borregas para el predio 2b. Los animales se encontraban identificados individualmente con una caravana visual. Se registraron datos de condición corporal (CC) individual en la escala de 1-5 con intervalos de 0,25.

El servicio del predio 2a consistió en una IATF. La sincronización se inició el 4/4/2020 con esponjas intravaginales de poliuretano impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 10 días, seguida de una inyección de 200 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica equina (GCe). Se realizó doble inseminación artificial cervical a las 48 y 56 horas de retiradas las esponjas. Se emplearon 4 borregos de 2 D como donantes de semen fresco. Se introdujeron borregos en proporción al 2% de la majada a los 14 días de la IATF y se los mantuvo por 68 días.

En el predio 2b, el servicio consistió en monta natural que comenzó el 3/3/20 con carneros Southdown al 3% durante 34 días. Se marcaron los carneros y se registró la monta por colegas participantes del proyecto ANII - FCE_3_2018_1_148540 arriba mencionado.

Las tomas de muestras fecales se realizaron de la misma forma que en la etapa 1. Se realizaron 5 muestreos fecales en distintos tiempos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4) en los siguientes momentos: el muestreo T_0 se llevó adelante al momento de realización del examen de ARA, el T_1 en el día 30 de gestación promedio, el T_2 en el día 60, el T_3 en el día 100 de gestación promedio y el T_4 próximo al parto.

En el predio 2a, la ecografía se realizó por un técnico a los 60 días de realizada la IATF. Los días de gestación y tipo de gestación (única/múltiple) se registraron a través de la ecografía y se corrigió por fecha de nacimiento de los corderos. Por otra parte, en el predio 2b la ecografía fue realizada por un técnico a los 30 y 60 días de realizado el servicio natural. Se calculó la edad gestacional en cada tiempo de muestreo de acuerdo con el registro de la monta y el tipo de preñez (única/múltiple) por ecografía.

Se registraron datos de CC individual en simultáneo con todos los muestreos fecales, como se describió anteriormente con una sensibilidad de 0,25 puntos. La condición corporal se registró independientemente de si los animales tenían materia fecal en el recto al momento de la toma de muestra.

6.2 Procesamiento de muestras en el laboratorio

6.2.1 Estandarización de metodologías: toma de muestra y métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas

En primer lugar, se llevaron a cabo variantes de la metodología de toma de muestra y del método de extracción *Fast Boiling Preparation* (Schunck et al., 1995) para la puesta a punto y estandarización de la metodología a utilizar. Se probó realizar la toma de muestra de forma individual por oveja en un frasco estéril con 15 mL de suero fisiológico y con una cantidad de boñigas de 1-2 g. Se realizó la extracción comparando la misma metodología, pero con un paso de agitación de la muestra pura (ANEXO A.A) y pura sin agitación utilizando el suero de lavado (ANEXO A.B). Se realizó la misma comparación con las mismas muestras en diluciones 1:10. Todas las extracciones de ADN realizadas en este trabajo fueron cuantificadas con “NanoDrop” (Thermo Fischer Scientific) y se registró la concentración de ADN (ng/μL), y las tasas de absorbancia a 260nm /280 y 230/260.

En todos los casos, se verificó la integridad del ADN extraído y se descartó la presencia de inhibidores mediante una PCR a tiempo final que amplifica un fragmento del gen 16S de bacterias y archaeas universal con los cebadores delantero: Bac27F y reverso: 534R (Barcellos, 2018; De Long, 1992; Ott et al., 2004; Delpiazzi et al., 2021) (ANEXO B).

6.2.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de dos predios independientes

Extracción de ADN y evaluación de su integridad

Se realizó extracción de ADN con la técnica *Fast Boiling Preparation* (ANEXO A.B) modificada que fue puesta a punto en el laboratorio para materia fecal de ovinos. Las mismas fueron cuantificadas. Se utilizaron entre 70 y 120 ng de ADN por reacción de PCR (Schunck et al., 1995; Barcellos, 2018). Los amplicones se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en solución tampón tris-acetato-EDTA (TAE) 1X teñido con bromuro de etidio, a 90 voltios y 150 mA durante 15 minutos, y visualización con un transiluminador con luz UV.

Recuento bacteriano en placa, contaminaciones de materia fecal ovina con diluciones seriadas de *C. jejuni*, PCR a tiempo real para detección de *C. jejuni* y control de extracción

Para verificar que las extracciones de ADN realizadas permitían la amplificación por la qPCR diseñada por Vondrakova et al. (2014) para la detección de *C. jejuni*, se realizaron contaminaciones artificiales de materia fecal ovina con cultivo puro y diluciones seriadas de *C. jejuni*. Se contaminó la materia fecal de una oveja (7120 La Estanzuela) con la cepa M3 de *C. jejuni*. Esta cepa había sido aislada e identificada por métodos bacteriológicos y moleculares en el laboratorio en un proyecto anterior. Como solución madre se utilizó una suspensión de bacterias cuya turbidez era equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 a partir de la solución madre y se las identificó del -1 al -6. Estas diluciones eran equivalentes a 10^7 - 10^2 -UFC/mL de *C. jejuni*. Se tomaron suspensiones de 1g de materia fecal en 10 mL de PBS 1X y se las contaminó con 1 mL de cada dilución. Se controlaron las diluciones -5 y -6 sembrando 100 μ L de cada una en placas de agar sangre, incubando a 42°C en condiciones de microaerobiosis por 48 horas y realizando un recuento de colonias.

Se llevaron a cabo extracciones de ADN con dos protocolos para cada contaminación de materia fecal con 10^7 - 10^2 -UFC/mL de *C. jejuni*. Se utilizó el kit “ZYMO Miniprep fecal/soil” (ANEXO C) y el método de *Fast Boiling Preparation* modificado (ANEXO A.B).

Para la detección de *C. jejuni* a través de qPCR, se emplearon los cebadores descritos por Vondrakova et al. (2014). Los cebadores y sondas de hidrólisis tienen como blanco un fragmento del gen *hipO* (hipuricasa) y el tamaño del amplicón es de 124 pb (ANEXO D). Las muestras contaminadas con las diluciones seriadas de la cepa M3 de *C. jejuni* se analizaron por este método. Se realizaron dos tandas de qPCR que presentaban variantes, la tanda 1 fueron extracciones realizadas con *Fast Boiling Preparation* (dilución 1:5) y extracciones con el kit *ZYMO*. La tanda 2 consistió en extracciones con *Fast Boiling Preparation* (dilución 1:5) y las mismas extracciones puras. Se compararon ambas tandas definiendo un umbral de fluorescencia de 0,05 y se utilizó como punto de corte un Ct de 38. Se calculó la sensibilidad de la técnica y se graficó el log de copias/reacción según el Ct en un gráfico de líneas para cada tipo de extracción por separado utilizando Microsoft Excel (Microsoft Excel, 2018). Se estimó la ecuación de la recta resultante de la regresión lineal y el coeficiente de determinación (R^2). A partir de la pendiente de la recta, se calculó la eficiencia según las ecuaciones C y D:

$$E = 10^{-1/pendiente} \quad (C)$$

$$\%E = (E - 1)100 \quad (D)$$

Las muestras de los predios 1a y 1b también fueron analizadas con la qPCR diseñada para detección de *C. jejuni*.

PCR para detección de especies de *Campylobacter*

Se llevó a cabo una PCR a tiempo final (ANEXO E, Linton et al., 1996) que detecta especies de *Campylobacter* a partir de las extracciones de ADN resultantes de las

muestras que se contaminaron con diluciones seriadas de la cepa M3 de *C. jejuni* y las muestras de los predios 1a y 1b. Los amplicones se observaron tal como se indicó anteriormente.

Purificación de productos de PCR, secuenciación y análisis bioinformático

Se realizó una purificación del producto de PCR con el protocolo descrito en el ANEXO F.A en 5 muestras. Se envió a secuenciar a MacroGen Inc. Seúl, Corea (equipo ABI3730XL) el amplicón de la extracción kit-1j (extracción realizada con el kit comercial y la muestra contaminada con la dilución -1 de la cepa M3 de *C. jejuni*) de la PCR a tiempo final para amplificar el gen *16S* de *Campylobacter* spp. y se secuenciaron 4 amplicones de los obtenidos para muestras al azar en la etapa 1. El análisis bioinformático consistió en la edición de las secuencias utilizando el programa SeqMan del paquete Lasergene 7.0 (DNASTAR).

Se utilizó la opción BLAST de la base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar la similitud en las secuencias obtenidas con secuencias de microorganismos existentes en la base de datos.

6.2.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de *Campylobacter* spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas

Extracción de ADN, control de extracción y detección de especies pertenecientes al género *Campylobacter*

La extracción de ADN se llevó a cabo de la misma forma que para etapa 1. El control de extracción de ADN y la detección de *Campylobacter* spp. se realizó de la misma forma que para la etapa anterior.

Purificación de productos de PCR y secuenciación

Se purificaron los productos de PCR de once muestras con un protocolo que utiliza pelotitas magnéticas (AMPure XP, ANEXO F.B) y se secuenciaron con presencia de especies de *Campylobacter* escogidas al azar de todos los tiempos de muestreo. Se utilizó el mismo procedimiento de edición y ensamblado descrito anteriormente.

6.3 Análisis estadístico de proporciones y patrones de excreción

6.3.1 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría (borrega/oveja) con presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de dos predios independientes

Se realizó un análisis exploratorio de los datos, cálculo de proporciones y cálculo muestral empleando el software RStudio 1.2.5001 (RStudio Team, Boston, MA) y los paquetes: pwr, Hmisc, dplyr, tidyr, epitools, ggplot2 y patchwork (Champely, 2018; Harell, 2020; Wickham, 2020a; Wickham, 2020b; Aragon, 2017; Wickham, 2016; Pedersen, 2019).

6.3.2 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de *Campylobacter* spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas

Se utilizó el software STATA 16.1 (StataCorp LP, College Station, Texas). Se realizaron análisis exploratorios de los datos obtenidos a partir de las muestras fecales para *Campylobacter* spp. Se hizo un cálculo de proporciones, intervalos de confianza y pruebas de comparación de proporciones para determinar si existían diferencias entre tiempos de muestreo y categorías por predio y comparando categorías de los diferentes predios. Se analizó la excreción de *Campylobacter* por hembra a nivel individual y se detalló si la misma era intermitente o consecutiva en cada caso. Se calculó si existían diferencias significativas para el tipo de excreción entre los predios. Se realizaron análisis exploratorios de las variables gestación y CC para evaluar su distribución y tendencias. Se ejecutaron análisis empleando regresión logística para asociar a la variable respuesta

(presencia de *Campylobacter* spp.) por tiempo de muestreo. Se utilizó la categoría como variable principal en todos los tiempos de muestreo y se sumó días de gestación en T₄. Las variables predio, CC y días de gestación (en T₁, T₂ y T₃) se evaluaron como modificadoras de efecto, interacción o confusión de las principales con el desenlace. Se comenzó con un modelo saturado por tiempo de muestreo y se lo comparó con la prueba de similitud (*likelihood-ratio test*) con un modelo simple que no contenía términos de interacción. En caso de que el resultado de la prueba de similitud fuera significativamente menor a 0,05, se evaluaba la significancia de cada término de interacción en el modelo saturado. De lo contrario, se continuaba modelando los datos removiendo todos los términos de interacción. Luego de la evaluación de efecto de interacción, se evaluó la posibilidad de las variables actuando como confusoras de la relación del principal predictor y la presencia de *Campylobacter* spp. El efecto de confusión se evaluó desglosando el modelo resultante de la interacción y calculando el porcentaje de cambio del OR de la categoría en cada modelo sucesivo. Si la variación fue mayor o igual a 10% se lo consideró confusor de la relación. En caso de que existieran variables que interactuaban en la relación de la categoría y la presencia de *Campylobacter* spp. o actuaban como confusoras, se reportó el modelo final por tiempo de muestreo (Wayne & Sullivan, 2021).

7. RESULTADOS

7.1 Toma de muestra, métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas y estandarización de metodologías

Se compararon dos variantes del método de *Fast Boiling Preparation* con y sin el paso de agitación de la muestra previo a la realización de la extracción. Se evaluó cuál variante era adecuada de acuerdo a la presencia del amplicón en la PCR 16S de archaeas y bacterias (Barcellos, 2018). Cuando se utilizó como molde de PCR la extracción de ADN pura, no se obtuvo un producto de amplificación en ninguno de los casos, por lo que no se pudo realizar una comparación entre ambos métodos. Por otra parte, cuando se utilizaron diluciones 1:10 de las extracciones, en todas las extracciones en donde no se realizó el paso de agitación, se obtuvo un fragmento de 507 pb. Para el protocolo con agitación se obtuvieron resultados variables: en algunos casos fragmentos de 507 pb y en otros no hubo producto de amplificación. Fue por esa razón que se empleó el protocolo de dilución de extracciones 1:10 y sin agitación para extracción de ADN en todas las muestras de campo. En la figura 2 se presentan los resultados de esta PCR. En la muestra colocada en el carril 4 (código 3S17) el resultado fue negativo.

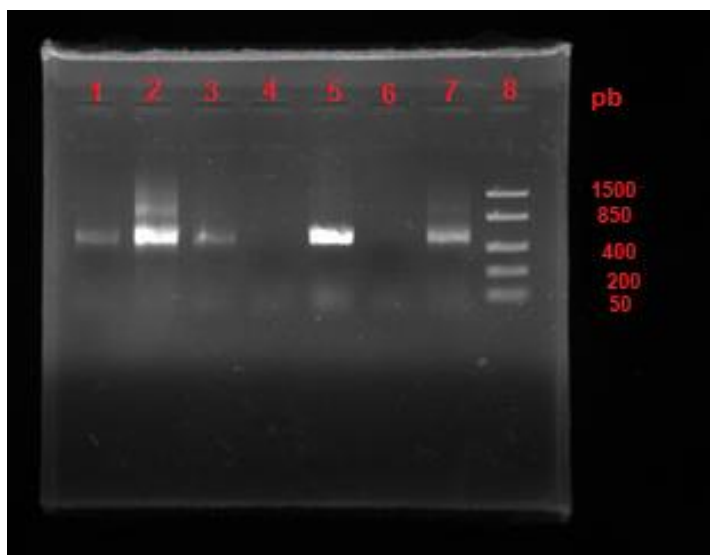


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al utilizar los cebadores que amplifican el gen *16S* de bacterias y archaeas. Carril 1: muestra código 3S10 dilución 1:10 (amplificación), carril 2: muestra código 3S12 dilución 1:10 (amplificación), carril 3: muestra código 3S14 dilución 1:10 (amplificación), carril: 4 muestra código 3S17 (sin amplificación), carril 5: control positivo muestra W11 (amplificación), carril 6: control negativo (sin amplificación), carril 7: amplicón 507 pb, carril: 8 marcador de peso molecular.

7.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría con presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de establecimientos rurales

7.2.1 Extracciones de ADN de las muestras de campo de los predios 1a y 1b, contaminaciones de materia fecal con diluciones seriadas de *C. jejuni* y control de extracción

Las extracciones de ADN de las muestras que provenían de los predios 1a y 1b por el método de *Fast Boiling Preparation* modificado presentaron una concentración de ADN media de 367,92 (IC 95% 319,70-416,15) y 604,42 (IC 95% 501,50-707,35) ng/μL, respectivamente. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:20 para que las extracciones de trabajo tuviesen una concentración entre 70 y 120 ng/μL de ADN. Las extracciones de ADN provenientes de las contaminaciones de materia fecal con suspensión de la cepa M3 de *C. jejuni*, extraídas por el método de *Fast Boiling Preparation*, presentaron una

concentración de ADN media de 171,33 (IC 95 % 116,15-226,51) ng/μL. Las extraídas con el kit *ZYMO Fecal Soil* tuvieron una concentración media de ADN de 9,05 (IC 95% 5,33-12,77) ng/μL. Los datos se presentan en el ANEXO G.

Los resultados de la evaluación mediante PCR de la integridad y la ausencia de inhibidores en el ADN bacteriano extraído se presentan en las tablas 1 y 2 para las muestras de campo. Todas las muestras y las contaminaciones seriadas con la cepa M3 de *C. jejuni* en la materia fecal por ambos métodos de extracción produjeron un amplicón específico para el control de extracción.

Tabla 1. Resultados de PCR para 16S ARNr de archaeas y bacterias, de *Campylobacter* spp. y qPCR para *C. jejuni* en muestras del predio 1a (borregas)

Muestra	Caravana	16S archaeas y bacterias	<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
P01	3818	Presencia	Ausencia	Ausencia
P02	3883	Presencia	Ausencia	Presencia
P03	414	Presencia	Ausencia	Presencia
P04	3850	Presencia	Ausencia	Presencia
P05	3837	Presencia	Ausencia	Presencia
P06	402	Presencia	Ausencia	Presencia
P07	3843	Presencia	Ausencia	Presencia
P08	3800	Presencia	Ausencia	Ausencia
P09	3847	Presencia	Ausencia	Presencia
P10	3828	Presencia	Ausencia	Ausencia
P11	3812	Presencia	Ausencia	Presencia
P12	3842	Presencia	Ausencia	Presencia
P13	3851	Presencia	Ausencia	Ausencia
P14	3880	Presencia	Ausencia	Presencia
P15	3847	Presencia	Ausencia	Presencia
P16	3889	Presencia	Ausencia	Presencia
P17	3834	Presencia	Ausencia	Presencia
P18	3853	Presencia	Ausencia	Presencia
P19	410	Presencia	Ausencia	Presencia
P20	416	Presencia	Ausencia	Ausencia
P21	3845	Presencia	Ausencia	Ausencia
P22	3833	Presencia	Ausencia	Ausencia
P23	3803	Presencia	Ausencia	Presencia
P24	413	Presencia	Ausencia	Presencia
P25	3841	Presencia	Ausencia	Presencia
P26	3832	Presencia	Ausencia	Presencia
P27	404	Presencia	Ausencia	Presencia
P28	3838	Presencia	Ausencia	Presencia
P29	411	Presencia	Ausencia	Presencia
P30	3844	Presencia	Ausencia	Presencia
P31	415	Presencia	Ausencia	Presencia
P32	3805	Presencia	Ausencia	Ausencia
P33	3819	Presencia	Ausencia	Presencia
P34	3839	Presencia	Ausencia	Presencia
P35	3840	Presencia	Ausencia	Presencia
P36	400	Presencia	Ausencia	Presencia
P37	401	Presencia	Ausencia	Presencia
P38	3856	Presencia	Ausencia	Presencia
P39	412	Presencia	Ausencia	Presencia

Tabla 2. Resultados de PCR para 16S ARNr de archaeas y bacterias, de *Campylobacter* spp. y qPCR para *C. jejuni* en muestras del predio 1b (ovejas).

Muestra	16S archaeas y bacterias	<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
M01	Presencia	Ausencia	Ausencia
M03	Presencia	Ausencia	Ausencia
M05	Presencia	Ausencia	Ausencia
M06	Presencia	Ausencia	Ausencia
M07	Presencia	Ausencia	Ausencia
M08	Presencia	Ausencia	Ausencia
M09	Presencia	Ausencia	Ausencia
M10	Presencia	Ausencia	Ausencia
M11	Presencia	Ausencia	Ausencia
M12	Presencia	Ausencia	Ausencia
M13	Presencia	Ausencia	Presencia
M14	Presencia	Ausencia	Ausencia
M15	Presencia	Ausencia	Ausencia
M16	Presencia	Ausencia	Ausencia
M17	Presencia	Ausencia	Ausencia
M18	Presencia	Ausencia	Ausencia
M19	Presencia	Ausencia	Ausencia
M20	Presencia	Ausencia	Ausencia
M21	Presencia	Ausencia	Ausencia
M22	Presencia	Ausencia	Ausencia
M23	Presencia	Ausencia	Ausencia

7.2.2 Recuento en placa de contaminaciones artificiales y qPCR para detección de *C. jejuni*

El recuento en placa de la dilución -6 de *C. jejuni* fue de 137 UFC. Se estimó que la suspensión madre de la cepa M3 de *C. jejuni* era de $1,37 \times 10^8$ UFC/mL. El plaqueo de la dilución -5 no permitió contar adecuadamente la cantidad de UFC por ser un número muy elevado. Los resultados de qPCR obtenidos para las extracciones de ADN realizadas a partir de las muestras fecales contaminadas con diluciones seriadas de *C. jejuni* se presentan en la tabla 3 (grupo 1 y 2 corresponden a dos corridas independientes).

Tabla 3. Resultados de la qPCR para detección de *C. jejuni* en muestras fecales contaminadas con diluciones de la cepa M3 de *C. jejuni*

Grupo 1		
Fecha de realización 28/10/2019		
Muestra	Resultado	Ct
fb -1j (1:5)	Presencia	29,2
fb -2j (1:5)	Presencia	32,3
fb -3j (1:5)	Presencia	35,0
fb -4j (1:5)	Presencia	37,2
fb -5j (1:5)	Ausencia	
fb -6j (1:5)	Ausencia	
fb 7120 (1:5)	Ausencia	
kit -1j	Presencia	25,1
kit -2j	Presencia	29,3
kit -3j	Presencia	31,9
kit -4j	Presencia	35,5
kit -5j	Ausencia	
kit -6j	Ausencia	

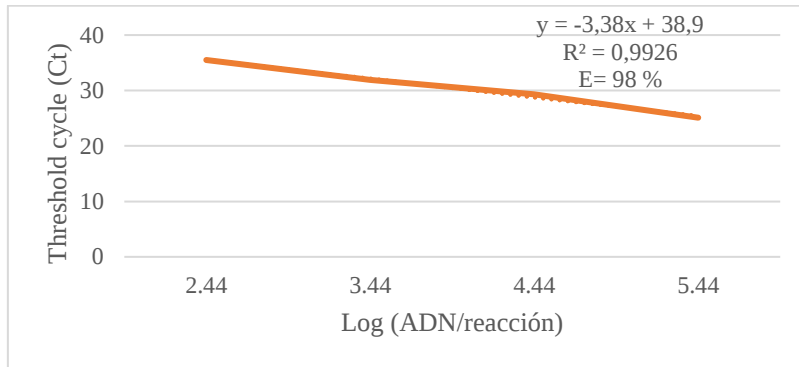
Grupo 2		
Fecha de realización 28/10/2019		
Muestra	Resultado	Ct
fb -1j (1:5)	Presencia	29,5
fb -2j (1:5)	Presencia	33,2
fb -3j (1:5)	Presencia	35,9
fb -4j (1:5)	Presencia	37,8
fb -5j (1:5)	Ausencia	
fb -6j (1:5)	Ausencia	
fb -1j	Presencia	27,9
fb -2j	Presencia	30,1
fb -3j	Presencia	34,3
fb -4j	Presencia	35,0
fb -5j	Ausencia	
fb -6j	Ausencia	
C+M3	Presencia	12,5

fb Fast boiling Preparation-1j, -2j, -3j, -4j, -5j, -6j (diluciones seriadas de suspensión de *C. jejuni* cepa M3), (1:5) diluciones, ciclo umbral 0,05 Ct

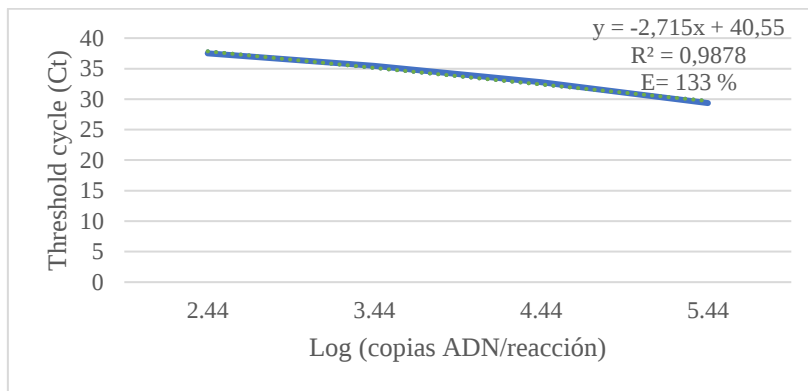
La qPCR diseñada por Vondrakova et al. (2014) para detección de *C. jejuni*, amplificó de la dilución -4 a la -1 en todos los casos. Se compararon los grupos definiendo un umbral de 0,05. El umbral se determinó observando las gráficas de amplificación de los controles positivos y se lo estableció en la fase exponencial. El punto de corte se estableció en un Ct de 38. Los controles positivos (extracción de ADN de cultivo puro de la cepa M3 de *C. jejuni*) de ambos grupos fueron positivos y los blancos (agua) resultaron negativos.

El rango dinámico fue de 274 copias/reacción a $2,74 \times 10^5$ copias/reacción. Cuando se realizó la extracción con el kit comercial, se logró una eficiencia de 97,6% mientras que para las extracciones realizadas por el método de *Fast Boiling Preparation* fueron 146% (puro) y 133% (dilución 1:5). Se presentan las regresiones lineales en la figura 3 con los cálculos de eficiencia. Los coeficientes de variación intra-ensayo variaron entre 0,02 y 2% y los inter-ensayo entre 0,72 y 2%.

A



B



C

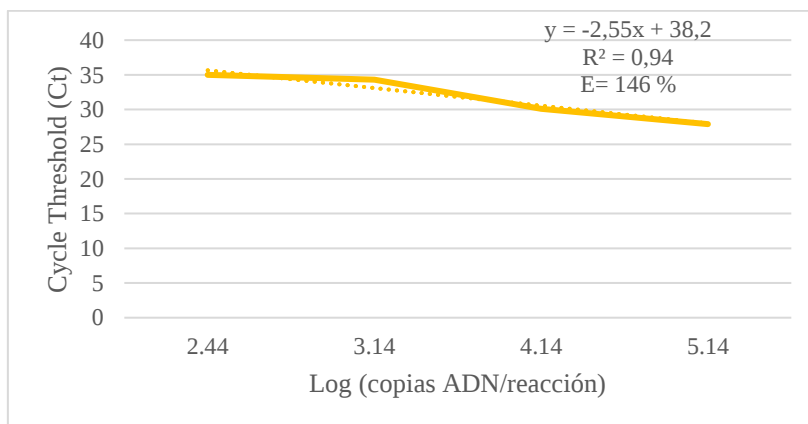


Figura 3. Gráficos de regresión lineal para cálculo de eficiencia de la qPCR para *C. jejuni*. A) Extracciones realizadas con el kit ZYMO fecal soil. B) Extracciones realizadas mediante Fast Boiling Preparation con dilución 1:5. C) Extracciones realizadas mediante Fast Boiling Preparation puras (sin diluir).

Las reacciones de qPCR para detección de *C. jejuni* de las muestras provenientes de los predios 1a y 1b fueron todas negativas. Los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

7.2.3 PCR para detección de especies de *Campylobacter*

Las muestras cuyas diluciones seriadas con *C. jejuni* fueron usadas para contaminar materia fecal ovina produjeron todas un amplicón específico al realizar la PCR que detecta el 16S de *Campylobacter* (incluida la materia fecal sin contaminación de la oveja 7120 La Estanzuela que produjo una banda tenue). Los resultados se presentan en la tabla 4. El control positivo produjo un amplicón específico y el blanco de PCR no produjo amplicón. En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados de las muestras de los predios 1a y 1b. En la figura 4 se presenta el gel de agarosa para esta PCR para muestras del predio 1a.

Tabla 4. Resultados de PCR para detección de 16S de *Campylobacter*

Muestra	Resultado
fb -1j (1:5)	Presencia
fb -2j (1:5)	Presencia
fb -3j (1:5)	Presencia
fb -4j (1:5)	Presencia
fb -5j (1:5)	Presencia
fb -6j (1:5)	Presencia
fb 7120 (1:5)	Presencia
kit -1j	Presencia
kit -2j	Presencia
kit -3j	Presencia
kit -4j	Presencia

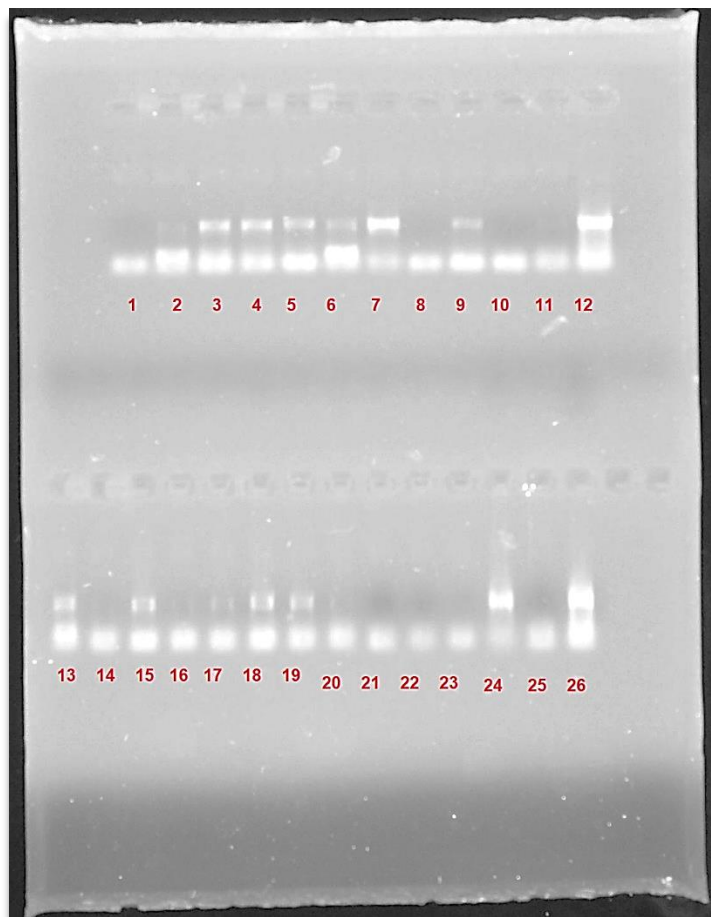


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % al utilizar los cebadores que amplifican el gen *16S* de *Campylobacter* spp. en las muestras codificadas P01-P22. Fila superior: carril 1: P01, carril 2: P02, carril 3: P03, carril 4: P04, carril 5: P05, carril 6: P06, carril 7: P07, carril 8: P08, carril 9: P09, carril 10: P10, carril 11: P11, carril 12: control de peso molecular amplicón 816 pb resultante de amplificación del gen *16S* de *Campylobacter* spp. Fila inferior: carril 13: P12, carril 14: P13, carril 15: P14, carril 16: P15, carril 17: P16, carril 18: P17, carril 19: P18, carril 20: P19, carril 21: P20, carril 22: P21, carril 23: P22, carril 24: control positivo, carril 25: control negativo, carril 26: control de peso molecular amplicón 816 pb resultante de amplificación del gen *16S* de *Campylobacter* spp.

7.2.4 Purificación de productos de PCR para detección de *Campylobacter* spp. y secuenciación

La secuencia del amplicón resultante de la PCR para el 16S ARNr de *Campylobacter* spp. de la muestra kit-1j (muestra fecal contaminada con la dilución -1 de la suspensión de la cepa M3 de *C. jejuni*, extracción realizada con kit ZYMO). En el cromatograma (figura 5) se observaron picos superpuestos, lo cual es indicador de la presencia de más de una especie de *Campylobacter* en la muestra.

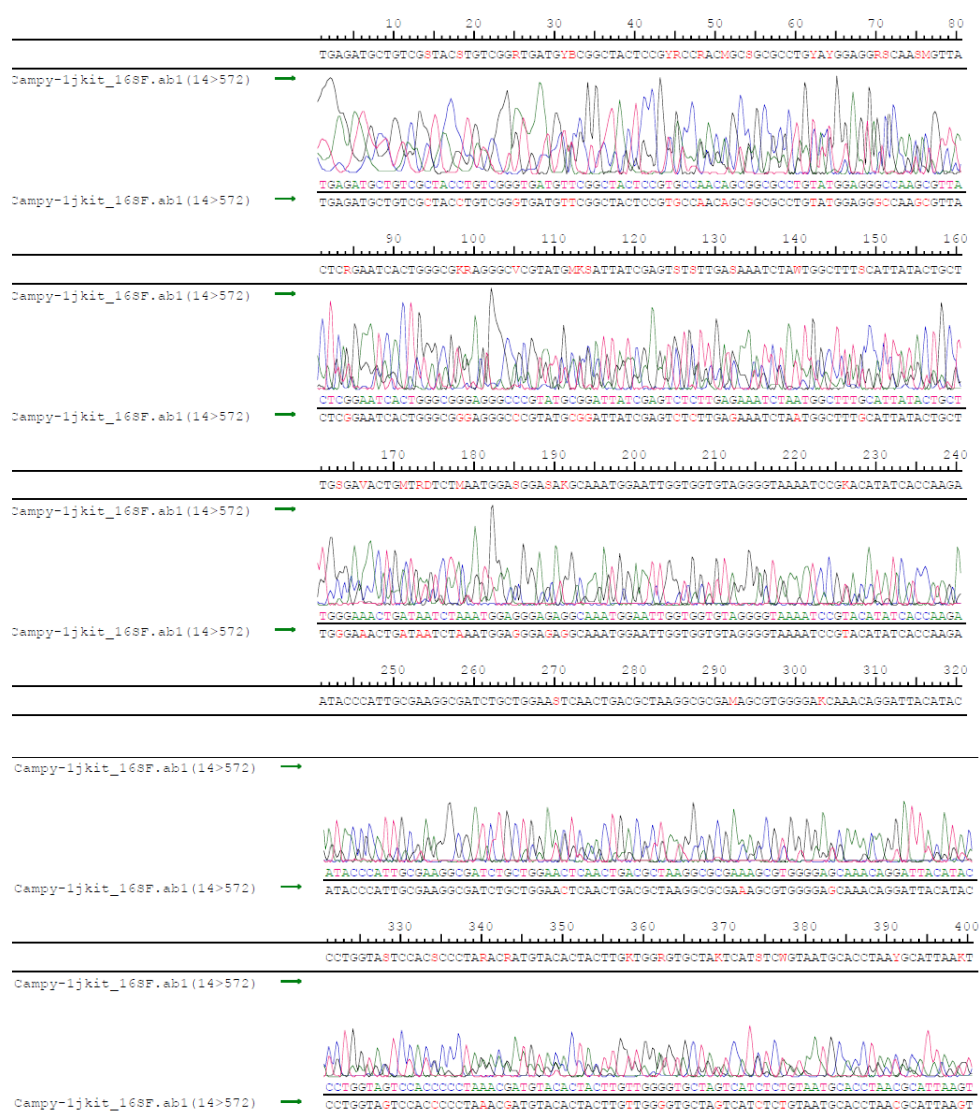


Figura 5. Cromatograma de la secuencia para la muestra kit-1j (muestra fecal contaminada con la dilución -1 de la suspensión de la cepa M3 de *C. jejuni*, extracción realizada con el kit ZYMO).

Se secuenciaron cuatro amplicones tomados al azar de los obtenidos a partir de muestras en la etapa 1 (identificadas como M13, P03, P07 y P14) para identificar la especie de *Campylobacter* presente. Las secuencias mostraron 98-100% de similitud con *C. lanienae*. En la figura 6 se presentan las primeras secuencias de la base de datos con identidad nucleotídica de la secuencia de la muestra P07.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Campylobacter sp. RM12175, complete genome	Campylobacter...	1382	4147	96%	0.0	99.87%	1583173	CP018793.1
✓	Campylobacter sp. RM8964, complete genome	Campylobacter...	1382	4147	96%	0.0	99.87%	1729336	CP018791.1
✓	Campylobacter lanienae strain MIT 11-152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Campylobacter...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	1469	KF192319.1
✓	Uncultured Campylobacter sp. clone TK202039 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Cam...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	791	MT131164.1
✓	Uncultured Campylobacter sp. clone TK202038 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Cam...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	789	MT131163.1
✓	Uncultured Campylobacter sp. clone TK202037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Cam...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	789	MT131162.1
✓	Campylobacter lanienae strain 0501500.1-C0292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Campylobacter...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	1365	HQ628642.1
✓	Uncultured bacterium clone BHSD_aaa04e04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bact...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	1377	EU474586.1
✓	Uncultured bacterium clone BHSD_aaa04g02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bact...	1382	1382	96%	0.0	99.87%	1377	EU474523.1
✓	Uncultured Campylobacter sp. clone TK202040 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Cam...	1376	1376	96%	0.0	99.73%	785	MT131165.1
✓	Uncultured bacterium clone BHSD_aaa03c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bact...	1376	1376	96%	0.0	99.73%	1377	EU474438.1

Figura 6. Identidad nucleotídica de la secuencia de la muestra P07 con secuencias de la base de datos.

7.2.5 Análisis estadístico de proporciones y cálculo muestral

Se calculó la proporción de muestras de los predios 1a y 1b con presencia de *Campylobacter*. En el predio 1a fue de 0,79 y en el predio 1b de 0,047. La prueba de comparación de proporciones reveló diferencias significativas ($p < 0,05$). Se utilizó para el cálculo muestral una proporción de 0,25 para el predio 1b por la proporción extremadamente baja que se encontró. El cálculo muestral para diferencia de proporciones se planteó con hipótesis unilateral ($\alpha = 0,05$ y potencia de 80%) y fue de 19 animales por grupo.

7.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de *Campylobacter* spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas

7.3.1 Aptitud reproductiva aparente, conformación de grupos en cada establecimiento y servicio

La conformación de los grupos se basó en el cálculo muestral realizado en la etapa 1 pero se ajustó a la realidad de la majada. En el predio 2a, se incluyeron 20 borregas de 2 D y 19 ovejas de 6 a 8 D identificadas individualmente con una caravana visual. En el predio 2b, se incluyeron 19 ovejas y 18 borregas identificadas de igual forma que en el otro predio. Los datos de los animales se presentan en el ANEXO H.

7.3.2 Muestreo fecal, ecografía y condición corporal

Las fechas en las cuales se realizaron los muestreos pre-fijados a los tiempos T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4 se presentan en la figura 7.

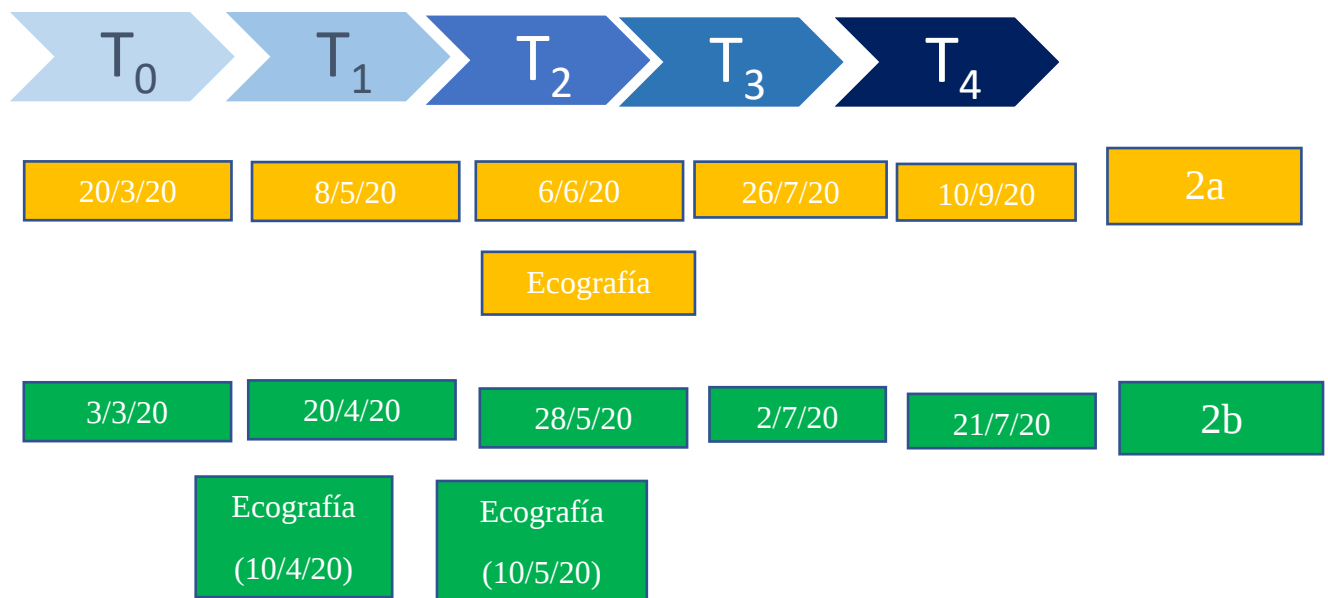


Figura 7. Representación gráfica de tiempos de muestreo con fechas de toma de muestra y determinación de condición corporal y de ecografía. Color anaranjado: predio 2a. Color verde: predio 2b.

La CC se determinó individualmente en el mismo momento que la extracción de las muestras fecales de los mismos animales. Se evaluó en los animales que se encontraban dentro del ensayo. La figura 8 presenta la CC en los dos predios por categoría y tiempo de muestreo. Los diagramas de caja representan la distribución del 50% de los datos. Se observó que la mayoría de los animales se ubicaban entre la CC 3 y 4 y que en la mayoría de los muestreos las ovejas presentaron una CC superior a la de las borregas. La tabla 5 resume la CC por tiempo de muestreo.

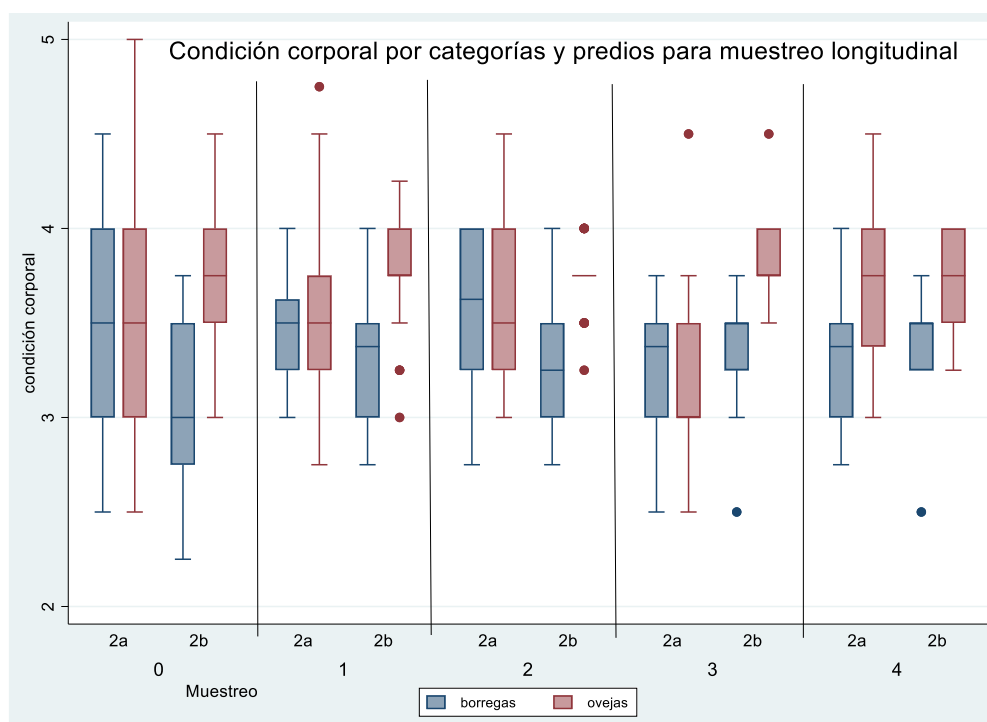


Figura 8. Condición corporal por categorías y predios para muestreo longitudinal.

Tabla 5. Condición corporal promedio por cada tiempo de muestreo en los predios 2a y 2b

Tiempo	Número de observaciones	Media condición corporal $\pm$ desviación estándar	Condición corporal adecuada en función del ciclo productivo*
T ₀	78	3,47 $\pm$ 0,57	3,00-3,50
T ₁	78	3,55 $\pm$ 0,41	2,50-3,00
T ₂	78	3,53 $\pm$ 0,40	2,50-3,00
T ₃	75	3,45 $\pm$ 0,42	3,00-3,50
T ₄	74	3,53 $\pm$ 0,36	3,00-3,50

*Según sugerencias del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL,2018).

Los datos reproductivos se resumen en el ANEXO H. Los días de gestación por animal se determinaron por el registro de la fecha de parto y las ecografías. Para el predio 2a, se tuvo en cuenta la fecha de parto y se completaron los datos faltantes con los de la ecografía. Para el predio 2b, se tuvo en cuenta el registro del servicio y dos ecografías en los días 30 y 60 de gestación. En las figuras 9 y 10 se presenta la distribución de los datos de días de gestación representados por diagramas de caja. En el predio 2a, la mediana de los días de gestación para borregas y ovejas fue similar. No se representaron las ovejas paridas en el predio 2a. Para el predio 2b se observó una diferencia mayor entre la mediana de días de gestación en las ovejas con respecto a borregas.

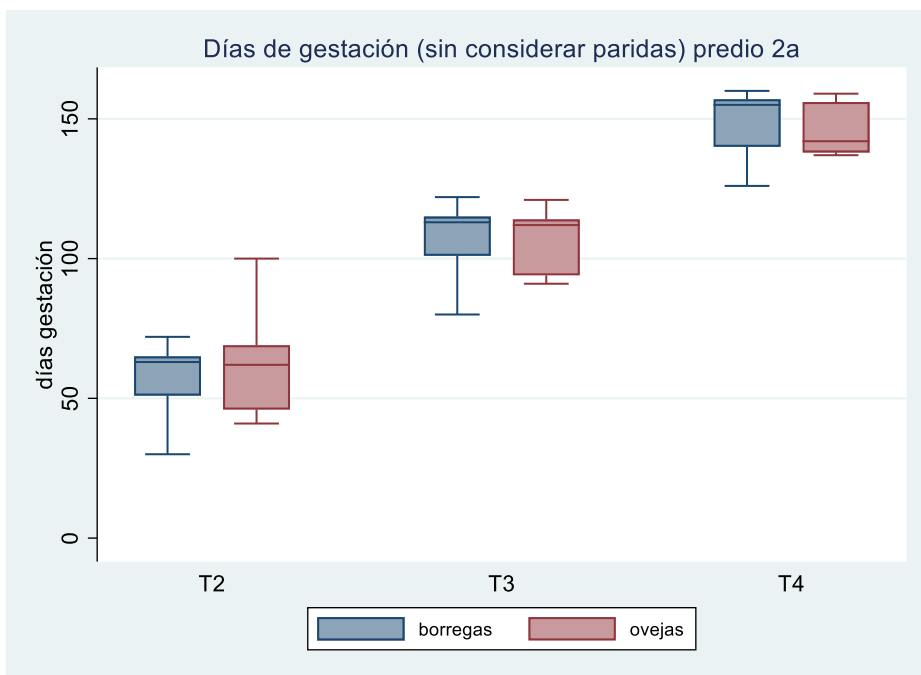


Figura 9. Días de gestación en hembras del predio 2a en T₂, T₃ y T₄

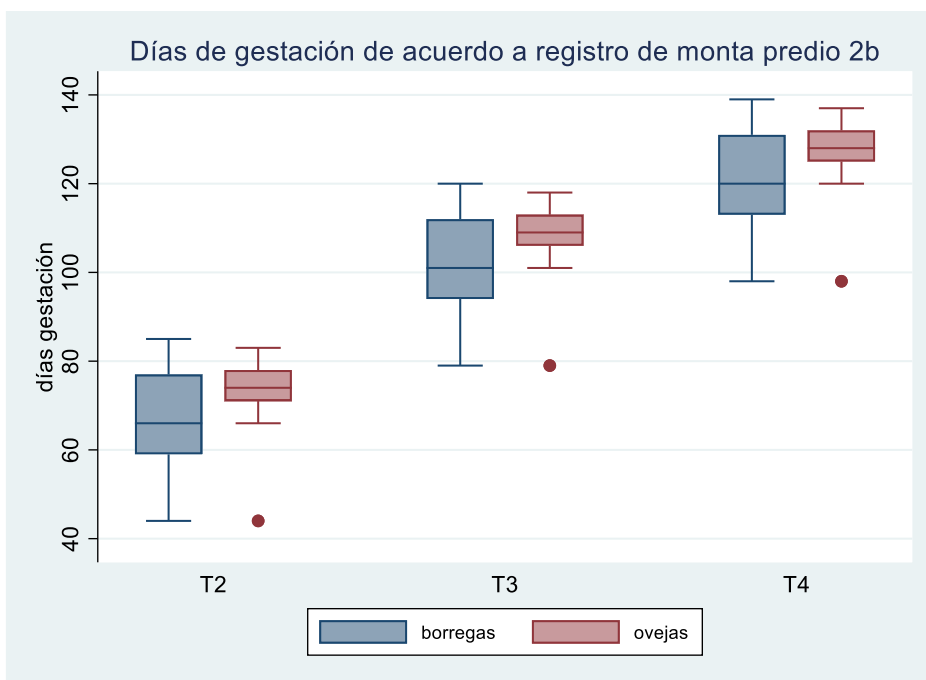


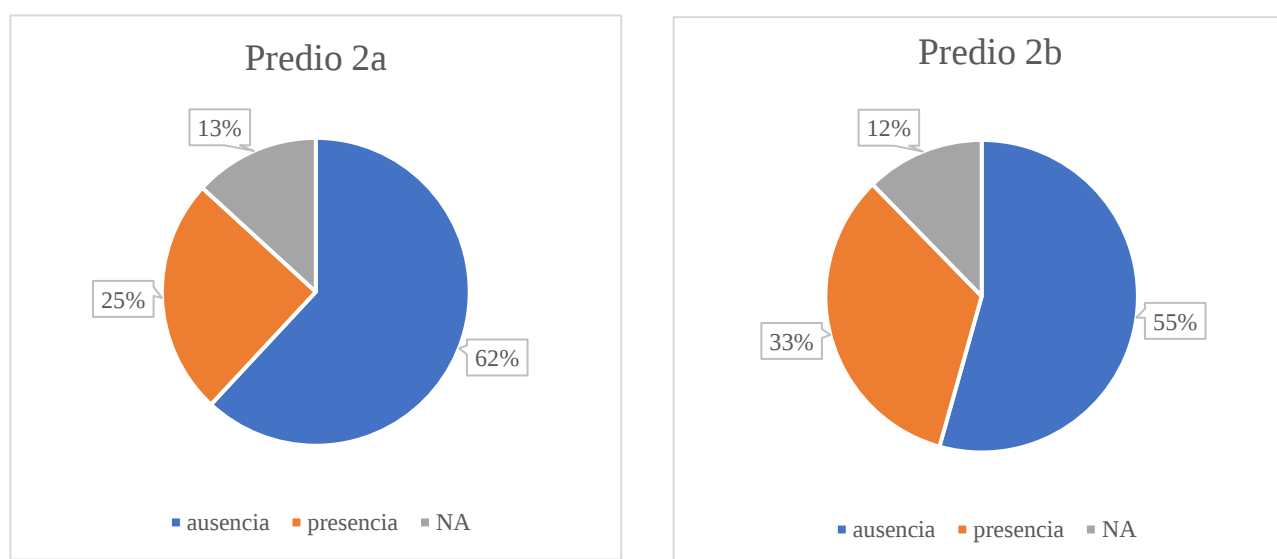
Figura 10. Días de gestación en hembras del predio 2b en T₂, T₃ y T₄

7.3.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio

Extracción de ADN, control de extracción y detección de especies de *Campylobacter*

Luego de pasar por el control de extracción para detección de 16S de archaeas y bacterias, y habiendo sido el mismo positivo, las muestras se analizaron para detección de *Campylobacter* spp.

En la figura 11 se presenta el total de muestras analizadas para la detección de *Campylobacter* spp. en los predios 2a y 2b en todos los tiempos de muestreo. En total se procesaron 171 muestras para el predio 2a de 39 animales y 171 para el predio 2b de 37 animales. 25 animales del predio 2a y 24 animales del predio 2b no presentaban materia fecal en el recto al momento del muestreo y por lo tanto no se pudo obtener una muestra.



NA: no analizada (no se encontraba materia fecal en el recto al momento del muestreo).

Figura 11. Muestras analizadas para detección de *Campylobacter* spp. en todos los muestreos predio 2a y 2b.

Del total de muestras analizadas para especies de *Campylobacter*, la diferencia en la proporción de muestras con presencia entre los predios 2a y 2b no fue significativa ($p>0,05$).

Purificación de productos de PCR y secuenciación

Se secuenciaron 11 amplicones de dos predios tomados al azar de los obtenidos en la etapa 2 (códigos 2S21, 3L10, 3L13, 3L34, 3S21, 3S28, 3S33, 4L13, 4S30, OL24 y OS11) para identificar la especie de *Campylobacter* presente. Se realizó la edición y ensamblado de las secuencias y 9 mostraron alta (97-100%) similitud con *C. lanienae* (figura 6). Los restantes amplicones (muestras 3S28 y 3S33) no produjeron secuencias limpias.

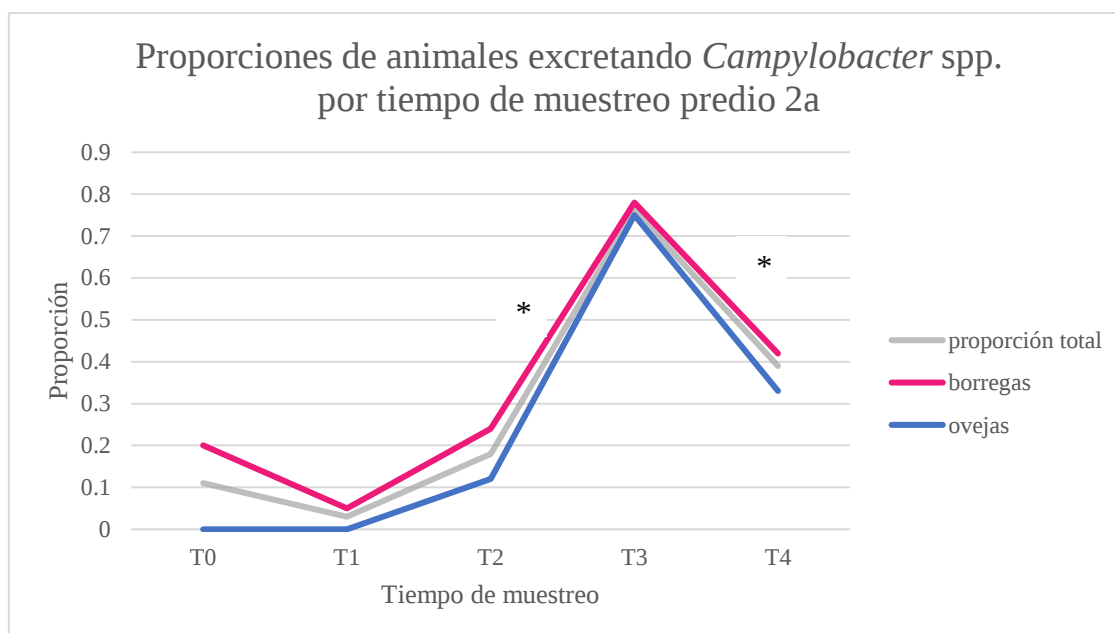
7.3.4 Análisis estadístico de proporciones de animales con presencia de *Campylobacter* spp. de acuerdo con los tiempos de muestreo según el predio, la categoría y otros factores asociados

Descripción de proporciones de animales excretando *Campylobacter* spp. a lo largo del ensayo por predio y categoría

La proporción de animales donde se detectó la excreción de especies de *Campylobacter* por predio y tiempo de muestreo se presentan en el ANEXO I. Se observa que hubo variaciones significativas ($p < 0,05$) a lo largo de los muestreos en ambos predios por categoría y en el total de animales.

Análisis por predio

En la figura 12 se presentan las proporciones por categoría y tiempo de muestreo en el predio 2a.

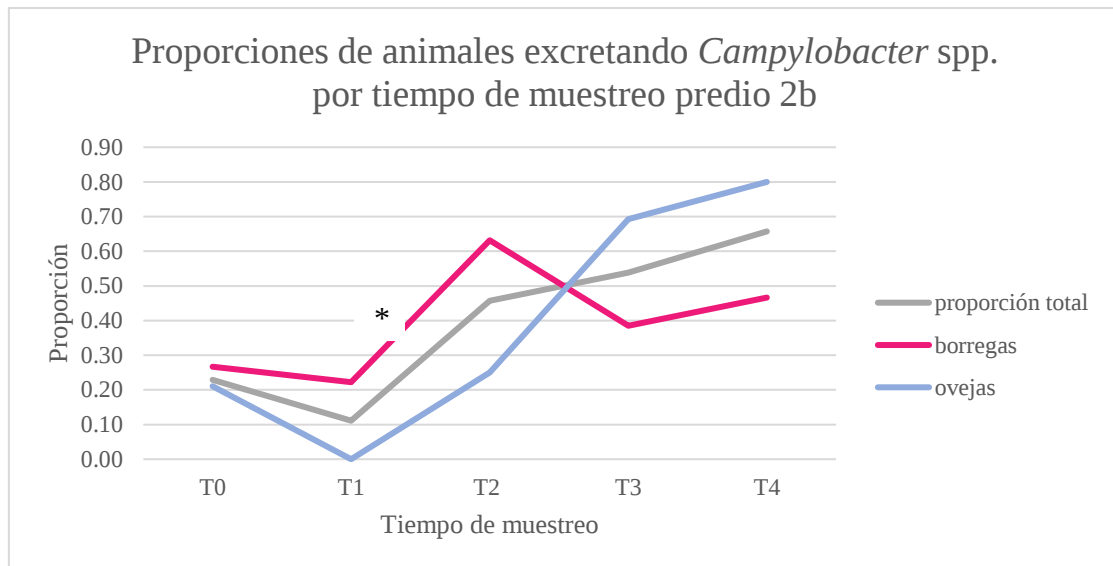


*Diferencia significativa para proporción total entre muestreos consecutivos. (Basado en IC 95 %)

Figura 12. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* spp. por tiempo de muestreo en el predio 2a

Se observó una variación en las proporciones de muestras con presencia de *Campylobacter* por tiempo de muestreo similar para borregas y ovejas a lo largo del ensayo, con diferencias significativas ($p < 0,05$) en la proporción total entre muestreos consecutivos de T₂ a T₃ y de T₃ a T₄. La proporción de borregas positivas se mantuvo por encima de la de las ovejas a lo largo de todo el estudio. En el muestreo T₃ se observó la máxima proporción en ambas categorías; las borregas presentaron una proporción de $0,78 \pm 0,10$ (IC 95 % 0,52-0,94) y las ovejas de $0,75 \pm 0,11$ (IC 95% 0,48-0,93). El mayor cambio en proporción total se dio entre los muestreos T₂ y T₃ donde hubo un incremento de 0,58.

En la figura 13 se presentan los cambios en proporciones que ocurrieron en el predio 2b. Entre T₀ y T₂ inclusive, la forma de la gráfica es similar para ambas categorías siendo la proporción de borregas positivas mayor que la de ovejas. La relación entre las categorías se invirtió en T₃ cuando la proporción de ovejas positivas superó a la de borregas. El pico máximo para borregas se dio en T₂ ($0,63 \pm 0,11$) y en ovejas existió un aumento a partir de T₁ alcanzando un máximo en T₄ ($0,80 \pm 0,09$).



*Diferencia significativa para la proporción total entre muestreos consecutivos basado en el intervalo de confianza del 95%.

Figura 13. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* spp. por tiempo de muestreo en el predio 2b

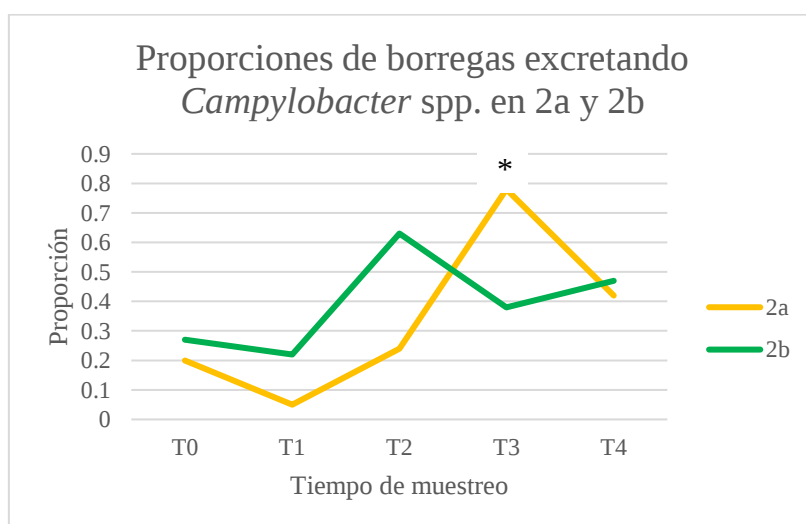
Dentro de las proporciones de cada categoría en cada predio (por tiempo de muestreo), los IC 95% calculados se solaparon. No se pudo concluir que estas proporciones en las poblaciones a las que pertenecían las muestras fuesen realmente diferentes. La proporción total más baja a lo largo de los muestreos fue en T₁ para ambos predios. En el predio 2a la proporción fue de $0,03 \pm 0,03$ (IC 95% $<0,001-0,15$) y para el predio 2b de $0,11 \pm 0,05$ (IC 95% $0,03-0,26$). Las pruebas de hipótesis de comparación de proporciones entre categorías por tiempo de muestreo fueron no significativas ($p > 0,05$) para todos los muestreos en el predio 2a y para el predio 2b fue significativa ($p < 0,05$) para T₁, T₂ y T₄. Los resultados de las pruebas de hipótesis significativas no coinciden con las conclusiones que derivan de los IC 95%.

Considerando la proporción total de animales positivos, indistintamente de la categoría, se observó que basado en los IC 95% se detectaron diferencias entre muestreos consecutivos entre T₁ y T₂. Las proporciones totales máximas por predio se encontraron en los muestreos T₃ para el predio 2a y en T₄ para el predio 2b. La proporción total en el

predio 2a fue $0,76 \pm 0,07$ (IC 95% 0,59-0,89) y para el predio 2b $0,66 \pm 0,08$ (IC 95% 0,48-0,81).

Análisis por categoría entre predios

Las proporciones de borregas y ovejas de los predios que excretaron *Campylobacter* spp. se presentan en el ANEXO I y en las figuras 12 y 13. La proporción más baja encontrada en borregas fue $0,05 \pm 0,05$ (IC 95% 0,001-0,26) en el predio 2a en el muestreo T₁. La máxima proporción en borregas en los dos predios fue $0,78 \pm 0,10$ (IC 95 % 0,52-0,94) en el mismo predio en el muestreo T₃ (figura 14). Los IC entre la proporción máxima y mínima no se solaparon significando que estas proporciones en la población donde se tomaron las muestras era diferente entre estos dos momentos de muestreo para esta categoría. Por otra parte, la proporción mínima encontrada en los muestreos para el predio 2b fue $0,22 \pm 0,10$ (IC 95% 0,06-0,48) y la máxima fue en T₂ de $0,63 \pm 0,11$ (IC 95% 0,38-0,84) y tampoco se solaparon los IC 95%. La mayor diferencia para las borregas entre proporción máxima y mínima fue de 0,73 en el predio 2a. Los IC 95 % en T₃ no se solaparon, indicando diferencias en ese momento de muestreo para esta categoría.



*Diferencia entre borregas de predios 2a y 2b basadas en el IC del 95%.

Figura 14. Proporciones de borregas excretando *Campylobacter* spp. en los predios 2a y 2b

La proporción mínima de ovejas que excretaron *Campylobacter* spp. fue detectada en T₀ en el predio 2a y en T₁ en ambos predios. Por el contrario, la proporción máxima fue $0,80 \pm 0,09$ (IC 95% 0,56-0,94) y se encontró en el predio 2b en T₄. En el predio 2a la mayor proporción fue $0,69 \pm 0,13$ (IC 95% 0,39-0,91) y ocurrió en T₃. Al comparar los IC 95% entre la proporción mínima y máxima en el predio 2a no hubo solapamiento, significando que a nivel poblacional las proporciones de ovejas que excretaron *Campylobacter* spp. eran diferentes. La mayor diferencia entre las proporciones máxima y mínima fue 0,80 (figura 15).

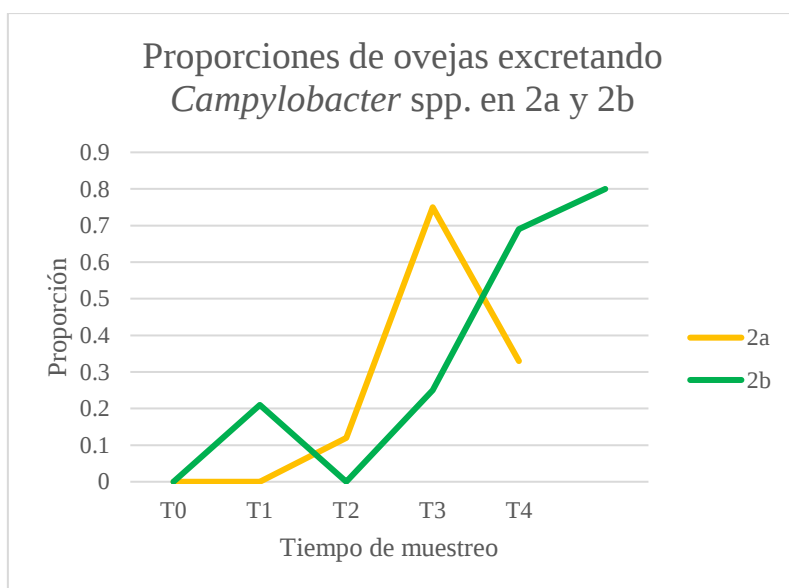


Figura 15. Proporciones de ovejas excretando *Campylobacter* spp. en los predios 2a y 2b

Análisis longitudinal de patrones de excreción de *Campylobacter* spp.

Predio 2a

Los patrones de eliminación fecal de *Campylobacter* spp. por hembra se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Excreción de *Campylobacter* spp. en el predio 2a

Caravana	Muestreo				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
272	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
279	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
401	Presencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
411	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA	Ausencia
412	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Ausencia
416	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Ausencia
3247	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
3535	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
3575	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
3603	Ausencia	NA	Ausencia	Ausencia	NA
3659	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
3672	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	NA
3697	Ausencia	NA	Ausencia	Presencia	Ausencia
3710	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3711	NA	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
3721	NA	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia
3723	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
3740	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Ausencia
3747	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Ausencia
3750	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Ausencia
3754	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3758	NA	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
3790	NA	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3800	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
3803	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	NA
3819	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
3820	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Presencia
3828	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
3833	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
3836	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
3837	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
3847	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
3848	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
3849	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3853	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3854	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
3855	Ausencia	NA	Ausencia	Presencia	Ausencia
3883	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
3896	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia

NA: no analizado (sin muestra en el recto al momento del muestreo).

	Excreción en muestreos no consecutivos.
	Excreción en muestreos consecutivos.

En el predio 2a, 6 hembras no presentaron en ningún muestreo presencia de *Campylobacter* spp. (3603 O, 3710 O, 3740 O, 3754 B, 3790 O y 3803 B) (O: código

para la categoría oveja, B: código para la categoría borrega). De 171 muestras pertenecientes al predio 2a que generaron datos de presencia/ausencia de *Campylobacter* spp. a lo largo del ensayo, 7 pertenecieron a individuos que presentaron presencia una sola vez. De esas 7 hembras, 3 fueron ovejas y eliminaron en los muestreos T₃ y T₄ y 4 fueron borregas y eliminaron en los muestreos T₀, T₂ y T₄. La frecuencia de nuevos animales excretando *Campylobacter* por muestreo se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Detalle de categorías de animales con detección de *Campylobacter* en un solo muestreo en el predio 2a

Muestreo	Nuevos animales con presencia de <i>Campylobacter</i> spp.	Categoría
T ₀	2	B
T ₁	0	-
T ₂	1	B
T ₃	1	O
T ₄	3	O (2) y B (1)

3 hembras eliminaron *Campylobacter* spp. en más de un muestreo no consecutivo. Por otra parte, 10 hembras presentaron presencia de *Campylobacter* spp. en su materia fecal en muestreos consecutivos, de las cuales 7 fueron borregas y 3 ovejas. Ninguna de las que presentaron *Campylobacter* spp. en muestreos consecutivos presentaron excreción de *Campylobacter* en otro muestreo no consecutivo. Las hembras que presentaron 2 muestreos en total con presencia de *Campylobacter* spp. fueron las identificadas con las siguientes caravanas: 279 O, 401 B, 3750 B, 3800 B, 3820 B, 3828 B, 3833 B, 3836 B, 3847 B y 3848 B.

Los animales que presentaron 3 muestras con presencia de *Campylobacter* spp., consecutiva o no consecutivamente, eran una oveja (3711 O) y borregas (3819 B y 3854 B). En todos los casos se presentaron consecutivas en T₂, T₃ y T₄.

Predio 2b

De 171 muestras pertenecientes al predio 2b que generaron datos de presencia/ausencia de *Campylobacter* spp. a lo largo del ensayo, 5 (353 A, 6413 V, 6450 V, 6640 A y 6725 A) no presentaron ninguna muestra con presencia de *Campylobacter* spp. 2 eran borregas y 3 ovejas. Los datos completos se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Excreción de *Campylobacter* spp. en el predio 2b

Caravana	Muestreo				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
91 A	Presencia	Ausencia	NA	Presencia	Presencia
204 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
212 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia
310 A	Presencia	Ausencia	NA	Presencia	Presencia
334 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
352 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
353 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Ausencia
366 A	Presencia	Ausencia	Presencia	NA	Presencia
387 A	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
419 A	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	NA
6008 V	Presencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
6046 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
6076 V	Presencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
6118 V	NA	Ausencia	Presencia	NA	Presencia
6157 V	Ausencia	Presencia	Presencia	NA	NA
6164 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
6200 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA	Ausencia
6203 V	NA	Presencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
6218 V	Presencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA
6272 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	NA
6273 V	Presencia	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia
6281 V	NA	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
6338 V	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
6413 V	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
6417 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Ausencia
6445 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
6450 V	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Ausencia
6461 V	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
6577 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
6580 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
6628 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
6632 A	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Ausencia
6640 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Ausencia
6653 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia
6655 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Presencia
6701 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia
6716 A	Ausencia	Ausencia	Presencia	NA	Presencia
6725 A	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NA	Ausencia
6796 A	Ausencia	Ausencia	NA	Presencia	Presencia

Excreción en muestreos no consecutivos.

Excreción en muestreos consecutivos.

NA: no analizado (sin muestra en el recto al momento del muestreo).

A: caravana amarilla, V: caravana verde.

13 fueron los individuos que presentaron presencia de *Campylobacter* spp. una sola vez. De estos, 7 fueron ovejas y fueron positivas en los muestreos T₃ y T₄ y 6 fueron borregas y resultaron positivas en los muestreos T₁ y T₂. La frecuencia de nuevos animales detectados por muestreo se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Detalle de categorías de animales con detección de *Campylobacter* en un solo muestreo en predio 2b

Tiempo de muestreo	Nuevos animales con presencia de <i>Campylobacter</i> spp.	Categoría
T ₀	0	-
T ₁	1	B
T ₂	5	B
T ₃	1	O
T ₄	6	O

B: borrega, O: oveja.

11 hembras se detectaron en más de un muestreo con eliminación de *Campylobacter* spp. en muestreos no consecutivos (caravanas 6008 V B, 6076 V B, 91 A O, 310 A O, 366 A O, 6203 V B, 6218 V B, 6273 V B, 6417 V B, 6461 V B, 6716 A O). 12 hembras presentaron *Campylobacter* spp. en muestreos consecutivos de las cuales 8 fueron ovejas (334 O, 419 O, 6577 O, 6628 O, 6655 A, 6796 A, 91 A, 310 A) y 4 borregas (6157 B, 6008 B, 6076 B, 6281 B). Las positivas en muestreos consecutivos y además en otro no consecutivo fueron 2 borregas (6008 V B y 6076 V B) y 2 ovejas (91 A O y 310 A O).

El grupo de animales que presentaron 3 muestras con presencia de *Campylobacter* spp. (consecutivamente o no) consistía en 4 ovejas. 3 borregas (6008 B, 6076 B y 6281 B) presentaron 4 muestras con presencia de *Campylobacter* spp. (consecutivamente o no). De los animales que presentaron 3 y 4 muestreos con excreción de *Campylobacter* spp., se observó que en 6 ocasiones presentaron *Campylobacter* spp. en T₀, todas presentaron

en T₄ y en 5 de 7 animales también en T₃. En la figura 16 se resume el número de animales con presencia de *Campylobacter* en 0, 1, 2, 3, 4 o 5 muestreos de ambos predios.

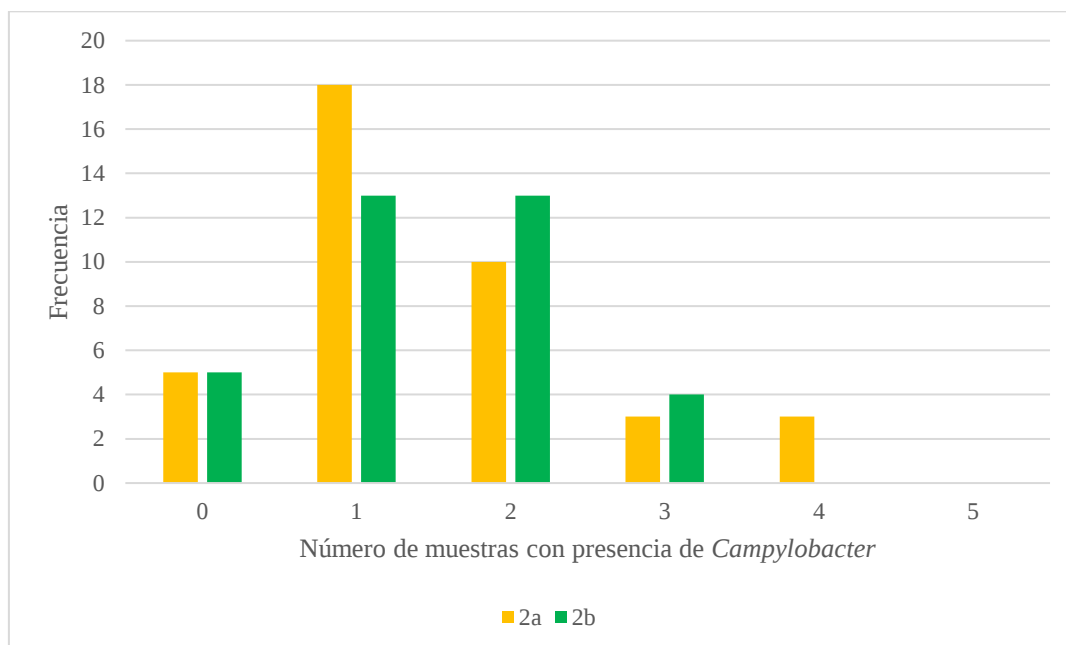


Figura 16. Número de individuos con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 muestras con presencia de *Campylobacter* spp. en ambos predios

Se comparó la proporción de hembras cuya excreción fue consecutiva entre predios, se obtuvo una diferencia no significativa ($p > 0,05$) de 0,10. También se analizó la proporción de hembras que presentaron excreción no consecutiva entre predios y la diferencia estimada fue 0,18 con un p valor significativo ($p < 0,05$).

Evaluación de factores por tiempo de muestreo

Modelos de regresión generados a partir de modelos saturados

Los modelos de regresión para cada tiempo de muestreo se realizaron para asociar la respuesta presencia de *Campylobacter* spp. en heces con las variables principales: categoría y días de gestación. Esto responde a la segunda parte de la hipótesis donde se

establece que la proporción de hembras eliminadoras fecales del agente varía con la categoría y momentos del ciclo productivo. Es esperable que, por la complejidad del problema a abordar, varias variables explican la excreción de forma significativa y que sufren efecto de modificación o confusión por otras que también se tuvieron en cuenta. Comenzar a modelar los datos con modelos saturados permite evaluar el efecto de modificación de la variable principal con otras. La modificación de efecto significa que la relación de la variable principal y otra afecta su relación con el desenlace y viceversa. Esto se realiza al generar términos compuestos de varias variables y compararlo con el modelo más simple. En caso de que la prueba de comparación de similitud sea significativa indica que el efecto de modificación está actuando. Luego de la evaluación de efecto de modificación se examina el efecto de confusión. Los efectos de confusión simbolizan aquellos donde factores pueden igualmente afectar la variable respuesta y la variable de interés. Su consideración es fundamental en estudios observacionales.

En el ANEXO J se presentan los detalles del procedimiento realizado para evaluar efecto de interacción entre las variables y confusión para cada tiempo de muestreo.

Tiempo 0

Se probó que el modelo saturado no presentaba una prueba de similitud significativa al compararlo con el modelo sin interacción por lo tanto se descartó la presencia de interacción significativa entre las variables categoría, predio y condición corporal ($P= 0,4359$). Se continuó a la evaluación de efecto de confusión a partir del modelo sin interacción. Esta resultó en que el modelo final para este tiempo de muestreo era el que se presenta en las ecuaciones E y F. En la tabla 10 se presentan los coeficientes resultantes del modelo de regresión. En la figura 17 se presenta una simulación de datos realizada a partir de la ecuación de regresión para borregas en los predios 2a y 2b, y para ovejas en los predios 2a y 2b.

$$\log(odds)=\beta_0+\beta_1\text{categoría} + \beta_2\text{cc} + \beta_3\text{predio} + \beta_4(\text{predio}*\text{categoría}) \quad (\text{E})$$

$$\log(odds)=-3.811+-1.52*\text{categoría} + 0.610*\text{cc} + -0.472*\text{predio} + 0.492*(\text{predio}*\text{categoría}) \quad (\text{F})$$

Tabla 10. Coeficientes para T₀ resultantes del modelo de regresión

	Borregas (0)	Ovejas (1)	Diferencia
Predio (0) = 2a	$\beta_0 + \beta_{2cc}$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_{2cc}$	$\beta_1\text{categoría}$
Predio (1) = 2b	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_{2cc} + \beta_3\text{predio}$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_{2cc} + \beta_3\text{predio} + \beta_4(\text{predio}*\text{categoría})$	$\beta_4(\text{predio}*\text{categoría})$

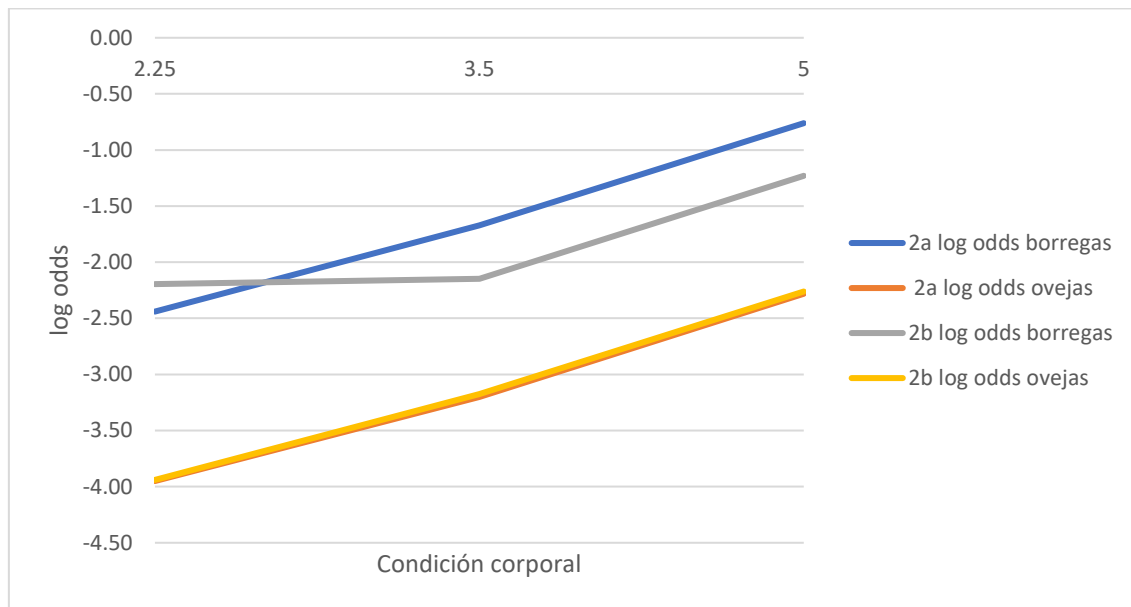


Figura 17. Log odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₀

Tiempo 1

La regresión convergió pero debido a que pertenecer a la categoría oveja se asociaba perfectamente a no presentar *Campylobacter* spp. al momento del muestreo, se omitieron todos los datos de las ovejas. Por lo tanto, no se reporta una ecuación para este tiempo de muestreo.

Tiempo 2

Se probó que el modelo saturado no presentaba una prueba de similitud significativa al compararlo con el modelo sin interacción por lo tanto se descartó la presencia de interacción significativa entre las variables categoría, predio, condición corporal y días de gestación ($P= 0.5842$). Se prosiguió a la evaluación de efecto de

confusión a partir del modelo sin interacción. Esta resultó en que el modelo final para este tiempo de muestreo fue el que se describe en las ecuaciones G y H. En la tabla 11 se presentan los coeficientes resultantes del modelo de regresión. En la figura 18 se presentan gráficamente los valores de log odds simulados.

$$\log(odds)=\beta_0+\beta_1\text{categoría} + \beta_2cc + \beta_3\text{predio} + \beta_4\text{gestación} + \beta_5(\text{predio*gestación}) + \beta_6(\text{gestación*cc}) + \beta_7(\text{predio*cc}) \quad (G)$$

$$\log(odds)=-4.81+-1.258*\text{categoría} + 1.275*cc + 6.79*\text{predio} + -0.0291*\text{gestación} + 0.020(\text{predio*gestación}) + 0.004 (\text{gestación*cc}) + -1.858 (\text{predio*cc}) \quad (H)$$

Tabla 11. Coeficientes para T2 resultantes del modelo de regresión

	Borregas (0)	Ovejas (1)	Diferencia
Predio (0) = 2a	$\beta_0 + \beta_2cc + \beta_4\text{gestación} + \beta_6 (\text{gestación*cc})$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_2cc + \beta_4\text{gestación} + \beta_6 (\text{gestación*cc})$	$\beta_1\text{categoría}$
Predio (1) = 2b	$\beta_0 + \beta_2cc + \beta_3\text{predio} + \beta_4\text{gestación} + \beta_5(\text{predio*gestación}) + \beta_6 (\text{gestación*cc}) + \beta_7(\text{predio*cc})$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_2cc + \beta_3\text{predio} + \beta_4\text{gestación} + \beta_5(\text{predio*gestación}) + \beta_6 (\text{gestación*cc}) + \beta_7(\text{predio*cc})$	$\beta_1\text{categoría}$
Diferencia	$\beta_3\text{predio} + \beta_5(\text{predio*gestación}) + \beta_7(\text{predio*cc})$	$\beta_3\text{predio} + \beta_5(\text{predio*gestación}) + \beta_7(\text{predio*cc})$	

No hubo efecto de modificación entre las variables y la categoría. Por otra parte, sí existió efecto de confusión conjuntamente entre predio y CC, así como entre días de gestación y CC. También días de gestación por sí sola fue una confusora de la relación entre categoría y excreción de *Campylobacter* spp.

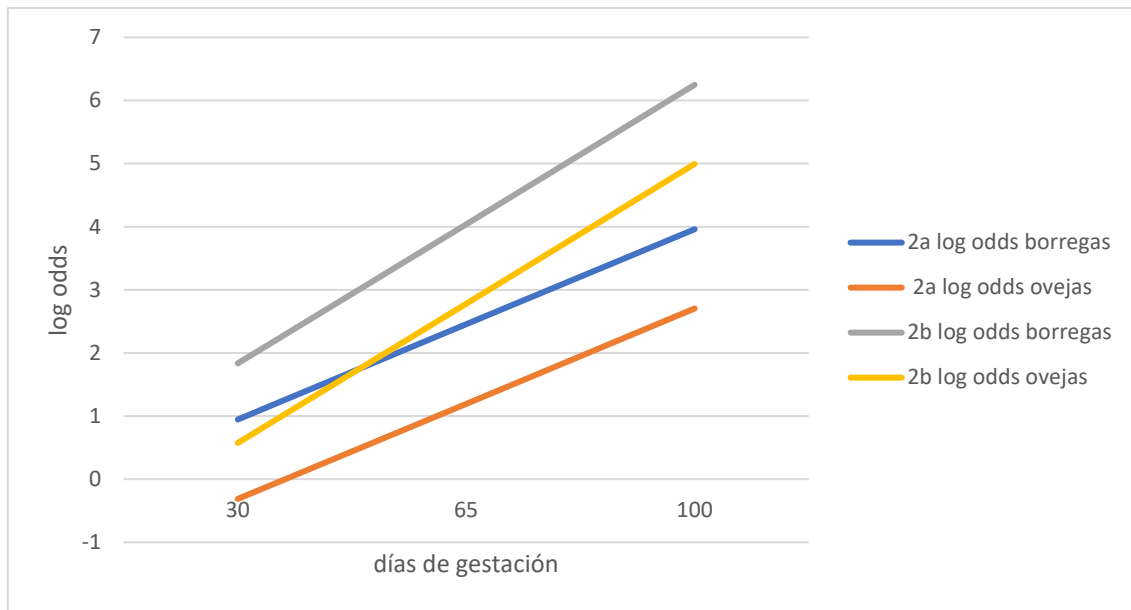


Figura 18. Log odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₂

Tiempo 3

Se probó que el modelo saturado presentaba una prueba de similitud significativa al compararlo con el modelo sin interacción ($P = 0.042$), por lo tanto, se evaluó término por término de acuerdo con la prueba de Wald para decidir si conservarlo en el modelo. Se representan gráficamente las interacciones significativas en las figuras 19 y 20.

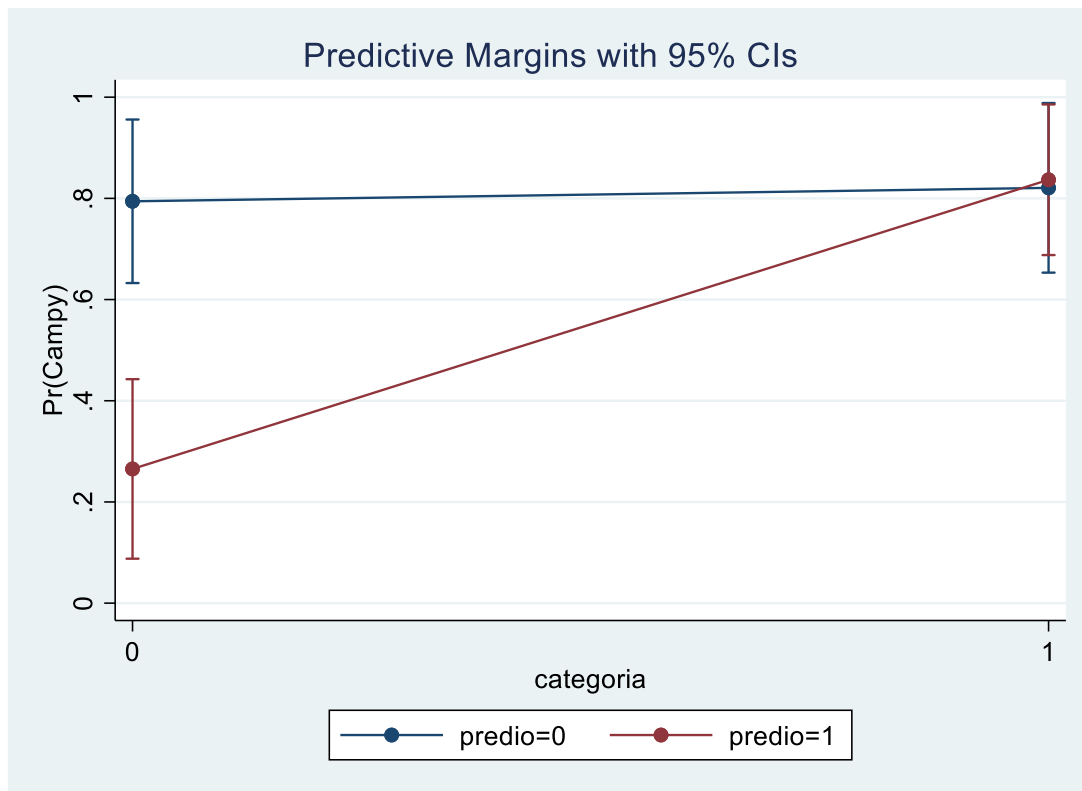


Figura 19. Evidencia de efecto de modificación entre categoría y predio en T₃

Debido a que hubo evidencia de modificación entre categoría y predio e interacción entre días de gestación y predio no se los evaluó como factores de confusión. Esto resultó en que el modelo final para este tiempo de muestreo fue el presentado en las ecuaciones I y J. En la tabla 12 se presentan los coeficientes resultantes del modelo de regresión y en la figura 20 los logs odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₃.

$$\log(odds) = \beta_0 + \beta_1 \text{categoría} + \beta_2 \text{cc} + \beta_3 \text{predio} + \beta_4 \text{gestación} + \beta_5 (\text{predio} * \text{gestación}) + \beta_6 (\text{categoría} * \text{predio}) \quad (\text{I})$$

$$\log(odds) = 18.9 + 0.24 * \text{categoría} + -3.41 * \text{cc} + -14.63 * \text{predio} + 0.128 * \text{gestación} + -0.266 * (\text{predio} * \text{gestación}) + 3.87 * (\text{categoría} * \text{predio}) \quad (\text{J})$$

Tabla 12. Coeficientes para T₃ resultantes del modelo de regresión

	Borregas (0)	Ovejas (1)	diferencia
Predio 2 ^a (0)	$\beta_0 + \beta_{2cc} + \beta_{4gestación}$	$\beta_0 + \beta_1 categoría + \beta_{2cc} + \beta_{4gestación}$	$\beta_1 categoría$
Predio 2b (1)	$\beta_0 + \beta_{2cc} + \beta_{3predio} + \beta_{4gestación} + \beta_5(predio*gestación)$	$\beta_0 + \beta_1 categoría + \beta_{2cc} + \beta_{3predio} + \beta_{4gestación} + \beta_5(predio*gestación) + \beta_6(categoría*predio)$	$\beta_1 categoría + \beta_6(categoría*predio)$

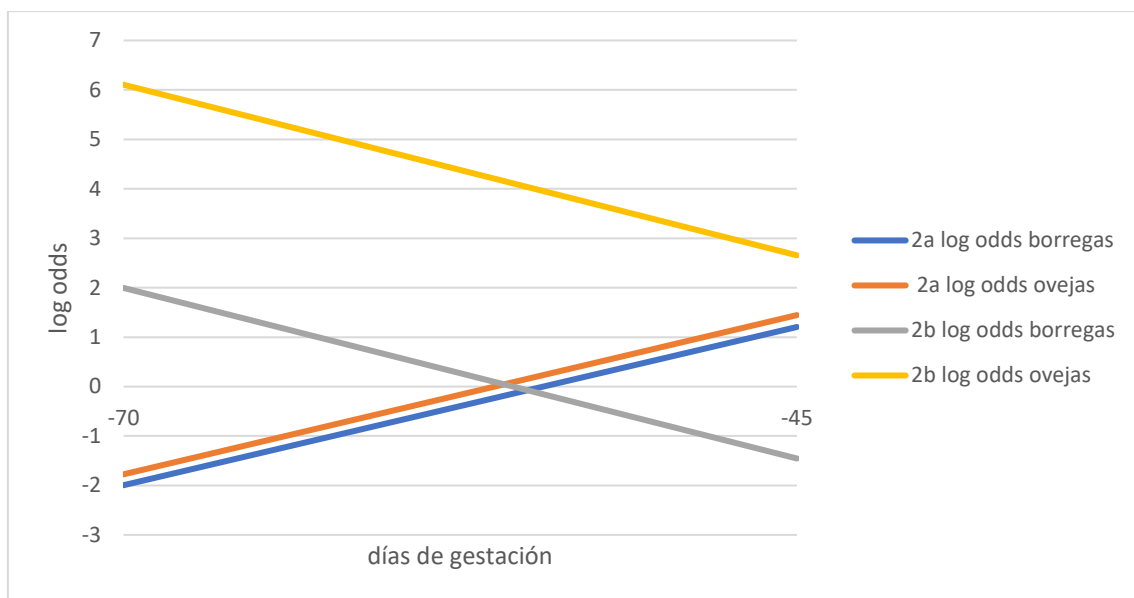


Figura 20. Log odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₃

Tiempo 4

Se probó que el modelo saturado presentaba una prueba de similitud significativa al compararlo con el modelo sin interacción ($P= 0.008$). Se evaluó término por término de acuerdo con la prueba de Wald. Se detectó evidencia de interacción entre predio y días de gestación en T₄ (figura 21). Las ecuaciones resultantes del modelo de regresión son las

ecuaciones K y L. Los coeficientes se presentan en la tabla 13. En la figura 22 se presentan log odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₄.

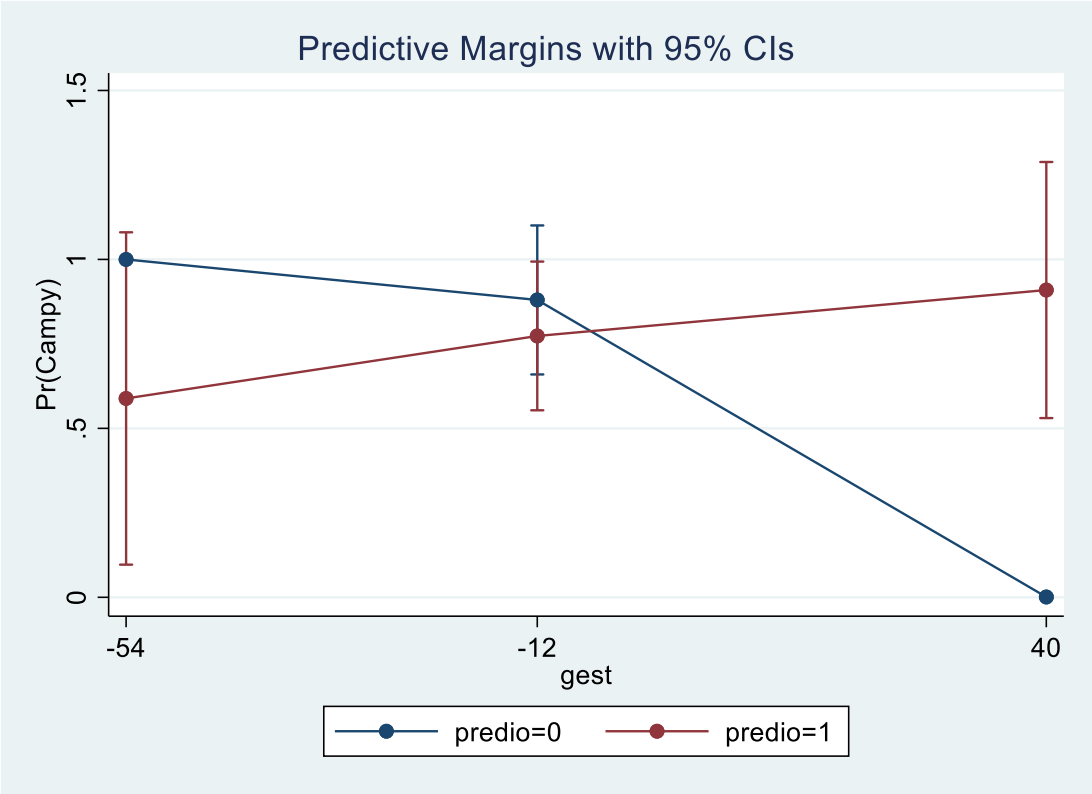


Figura 21. Evidencia de interacción entre predio y gestación en T₄

$$\log(odds)=\beta_0+\beta_1\text{categoría} + \beta_2\text{predio} + \beta_3\text{gestación} + \beta_4(\text{predio}\ast\text{gestación}) \tag{K}$$

$$\log(odds)=-0.153+0.18\ast\text{categoría} + -1.516\ast\text{predio} + -0.173\ast\text{gestación} + -0.193\ast(\text{predio}\ast\text{gestación}) \tag{L}$$

Tabla 13. Coeficientes para T₄ resultantes del modelo de regresión

	Borregas (0)	Ovejas (1)	Diferencia
Predio 2a (0)	$\beta_0 + \beta_3\text{gestación}$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_3\text{gestación}$	$\beta_1\text{categoría}$
Predio 2b (1)	$\beta_0 + \beta_2\text{predio} + \beta_3\text{gestación} + \beta_4(\text{predio}*\text{gestación})$	$\beta_0 + \beta_1\text{categoría} + \beta_2\text{predio} + \beta_3\text{gestación} + \beta_4(\text{predio}*\text{gestación})$	$\beta_1\text{categoría}$

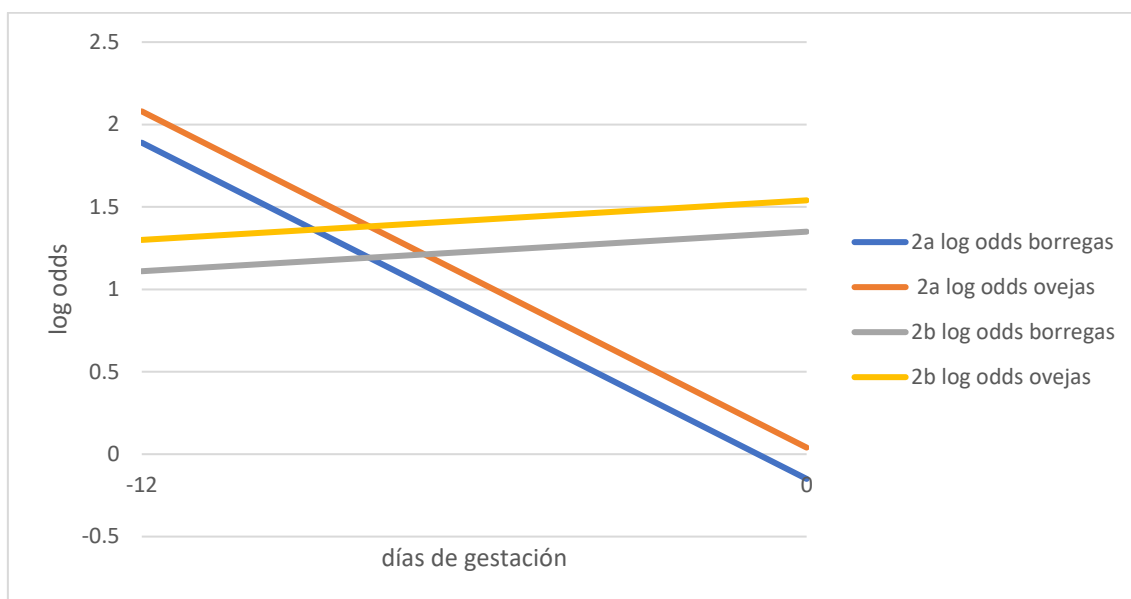


Figura 22. Log odds simulados a partir de ecuación de modelo de regresión para T₄

8. DISCUSIÓN

8.1 Toma de muestra, métodos de extracción de ADN a partir de heces ovinas y estandarización de metodologías

La toma de muestra, método de extracción de ADN y estandarización de metodologías es fundamental que sean óptimas para el logro de uno de los objetivos planteados: detección de especies de *Campylobacter* en materia fecal ovina. Las heces de rumiantes son una matriz compleja, ya que contienen un elevado número de componentes endógenos (del animal) y exógenos (de la dieta). Estos componentes incluyen una diversidad de microorganismos y una alta cantidad de fibra (47-68%) proveniente de residuos vegetales no digeridos (celulosa, hemicelulosa y lignina) (Rapp, 2010).

Para determinar el peso de la muestra necesaria se tuvo en cuenta que en los trabajos que extrajeron ADN directamente de heces de rumiantes para detección de *Escherichia coli* y *Campylobacter*, un 59% correspondían a muestras menores a 0,3 g, un 1% entre 0,3-1 g y un 23% a muestras mayores a 1 g (Rapp, 2010). En estos trabajos, la principal limitante de la unidad de muestra era el volumen de las muestras y su conservación hasta el procesamiento en el laboratorio (Stewart et al., 1998; Inglis & Kalischuk, 2003; Sharma & Dean-Nystrom, 2003). En este ensayo, el tamaño de los frascos utilizados para la toma de muestra y su almacenamiento a -20°C permitió que el espacio no fuese una limitante en la cantidad de muestra a utilizar para luego realizar la extracción de ADN. El protocolo de muestreo a nivel de campo consistió en tomar 5 boñigas fecales directamente del recto, lo cual minimiza las posibilidades de contaminación con bacterias del ambiente. Este protocolo resultó práctico y no enlenteció la toma de muestra en su conjunto. En estudios realizados a partir de muestras fecales de bovinos, se obtuvo que la detección de *E. coli* O157 era más eficiente en unidades de muestra mayores a 1 g (Echeverry et al., 2005). El peso de la materia fecal ovina varía de acuerdo con el contenido acuoso y la dieta, pero se tuvo en cuenta que muestras demasiado reducidas podían afectar la detección de *Campylobacter*. Por este motivo, se establecieron 5 boñigas fecales que superan ampliamente muestras de 1 g (Lorimor et al., 2004.). De acuerdo con determinaciones que se realizaron en el laboratorio el peso de las boñigas es sumamente variable, alrededor de 1g por cada una.

Con respecto al agregado de suero fisiológico, el lavado es ideal para materia fecal con consistencia compacta y seca como la ovina (Rapp, 2010). Existen varios estudios realizados para *E. coli* O157, encontrándose hasta 1000 veces más este microorganismo en la corteza con respecto a la médula de la materia fecal (Naylor et al., 2003; Pearce et al., 2004; Robinson et al., 2005). No se encontraron estudios similares para *Campylobacter*. Sin embargo, en la revisión realizada por Rapp (2010) se resumen las técnicas de extracción de ADN de materia fecal de rumiantes para detección de *E. coli* y *Campylobacter*. Esto sugiere que las técnicas para detección de *E. coli*, con las que se realizaron la mayoría de los estudios, son aplicables para *Campylobacter*. Esta revisión se basa en materia fecal de bovinos y existe poca información acerca de la microbiota del intestino grueso en ovinos (Rapp, 2010; Durso et al., 2010, 2011; Shanks et al., 2011; Kim et al., 2014; Tanca et al., 2016; Castro-Carrera et al., 2014; Kittelmann et al., 2015; Morgavi et al., 2015; Mao et al., 2015).

En este estudio se probaron variantes de la técnica *Fast Boiling Preparation* y se realizó la PCR que amplifica el gen 16S de archaeas y bacterias de modo de evaluar la integridad del ADN extraído. Se probaron protocolos basados en la homogeneización de una o media boñiga en suero fisiológico (datos no mostrados) y se comprobó que el protocolo que no incluía paso de agitación de la materia fecal con el suero fue el más eficiente. Por esto se optó por emplear este protocolo en las muestras de campo. Por otra parte, esto coincide con lo descrito en la revisión de Rapp (2010) y en otros trabajos (Naylor et al., 2003; Pearce et al., 2004; Robinson et al., 2005; Barcellos, 2018).

Todas las muestras de campo produjeron un amplicón específico, por lo que se descartó que la sensibilidad estuviese afectada y se impidiera la amplificación. Se hipotetiza que el paso de agitación liberó una cantidad y calidad de ADN que afectó la capacidad de detección de la PCR (Rapp, 2010). Se determinó que el método *Fast Boiling Preparation* puesto a punto para materia fecal ovina era una metodología adecuada y económica. Hasta donde sabemos, la detección de agentes como *Campylobacter* directamente de materia fecal de ovinos no se ha realizado a partir de este método de extracción. Es por este motivo, que consideramos que la puesta a punto de esta técnica es

un aporte importante para futuros estudios de *Campylobacter* spp. en ovinos en nuestro país.

8.2 Etapa 1. Pre-ensayo. Proporción de hembras ovinas por categoría con presencia de *Campylobacter* spp. a nivel de predios

Al momento de diseñar un estudio, el cálculo muestral es un aspecto metodológico de suma importancia por razones éticas y económicas (Faber & Fonseca, 2014). Hasta donde sabemos, al realizar esta tesis no existían datos que permitieran realizar una estimación de cálculo muestral necesario para detectar diferencias entre categorías en nuestras condiciones de producción. La realización de un cálculo muestral es importante para garantizar que se reclutarán un número suficiente de animales para comprobar diferencias entre categorías como establece nuestra hipótesis de investigación.

8.2.1 Extracciones de ADN para muestras de campo en los predios 1a y 1b, contaminaciones de materia fecal con diluciones seriadas de *C. jejuni* y control de extracción

Se realizó la extracción de ADN de todas las muestras de los predios 1a y 1b con el mismo protocolo. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medianas de la cantidad de ADN de las extracciones. Esta diferencia pudo deberse a que es una técnica *in-house* y la cantidad de ADN extraído varía. De modo de estandarizar la técnica se utilizaron 200 μL de solución de lavado para la extracción. La cantidad de ADN por reacción de PCR se estandarizó cuantificando las extracciones y realizando diluciones de modo que la concentración de cada dilución utilizada como molde de PCR estuviese entre 70 y 120 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN, tomando en cuenta que este ADN es una combinación de genomas de diferentes fuentes y no sólo están presentes las bacterias que se pretenden detectar, sino ADN genómico del animal, de otros componentes de su microbiota intestinal y de su dieta.

El agregado de suspensiones seriadas de *C. jejuni* a la materia fecal de la oveja 7120 La Estanzuela, tenía como objetivo comprobar si la qPCR diseñada por Vondrakova et al. (2014) para la detección de *C. jejuni* era capaz de amplificar a partir de una matriz compleja como es la materia fecal ovina una cantidad de bacterias en el rango detectado en otros estudios (Ogden et al., 2009; Stanley & Jones, 2003; Stanley et al., 1998). La extracción de ADN en paralelo por un método casero (*Fast Boiling Preparation*) y uno comercial (*kit ZYMO fecal soil*), tuvo como objetivo comparar las técnicas en cuanto a amplificación del gen *16S* de archaeas y bacterias y *16S* de *Campylobacter* por PCR a tiempo final, y el gen *hipO* de *C. jejuni* por qPCR. La metodología utilizada para realizar la adición de suspensiones seriadas de *C. jejuni* en materia fecal ovina intentó imitar que una mayor cantidad de *Campylobacter* se encontraran en la corteza de la boñiga fecal y que estarían presentes en la solución de lavado como propone Rapp (2010). La suspensión de bacterias se agregó a un tubo con boñigas (sin romper) y una solución de PBS 1X y se agitó. La extracción de ADN se realizó con el kit y en paralelo con *Fast Boiling Preparation* a partir del mismo volumen de muestra. El kit comercial no especifica de qué sector de la materia fecal se debe tomar la muestra para extracción de ADN. La muestra se tomó del líquido de lavado (solución fisiológica) de la materia fecal. Se tomó esta decisión de modo que fuese lo más similar posible a la técnica casera. La metodología fue meticulosa en cuanto a comparar las técnicas lo más justamente posible y poder tomar conclusiones acerca de su utilidad en este trabajo.

Todas las muestras produjeron un amplicón específico al utilizar la PCR que amplifica el gen *16S* de archaeas y bacterias. Por este motivo se concluyó que la técnica de *Fast Boiling Preparation* era una técnica adecuada además del método comercial de extracción para permitir la amplificación de bacterias y archaeas en general. No se encontraron estudios similares en ovinos que comparan técnicas de extracción de ADN *in-house* con métodos comerciales. Otro estudio realizado en materia fecal canina que se llevó a cabo en nuestro laboratorio estandarizó la detección de *Campylobacter* spp. de forma similar. Se comparó la extracción de ADN con el *kit Qiagen* con una variante de *Fast Boiling Preparation*. En ese caso también se concluyó que la técnica *in-house* era igualmente eficiente a la comercial (Barcellos, 2018).

8.2.2 qPCR para la detección de *C. jejuni*

La OIE recomienda la detección de especies de *Campylobacter* por aislamiento e identificación bioquímica (OIE, 2018). Se reconoce que algunas especies presentan labilidad y su crecimiento es lento, por lo tanto, su caracterización puede complementarse con métodos moleculares. Las técnicas moleculares por sí solas son adecuadas, pero requieren un proceso de validación. En varios trabajos se ha probado que algunas especies de *Campylobacter*, entre ellas *C. jejuni*, pueden entrar en un estado viable pero no cultivable en condiciones adversas. Este estado no es posible detectarlo utilizando técnicas de cultivo, pero sí mediante técnicas moleculares. En este estado, las células mantienen su potencial patogénico que se manifiesta cuando salen de este estado ante condiciones favorables (Lv et al., 2020; Magajna et al., 2015; Chaverach et al., 2015).

En el presente trabajo se probó que la qPCR diseñada por Vondrakova et al. (2014) que amplifica el gen *hipO* de *C. jejuni*, es capaz de amplificar a partir de extracciones de ADN de muestras de fecas ovinas. Según nuestro conocimiento, este es el primer ensayo que a partir de muestras fecales ovinas contaminadas artificialmente se realizó detección de *C. jejuni* por qPCR. Los resultados obtenidos sugirieron que la PCR para detección de *C. jejuni* permitió detectar el mismo rango de suspensiones seriadas de *C. jejuni* agregadas a una muestra fecal ovina por ambos métodos de extracción de ADN. Las cargas bacterianas utilizadas para contaminar la materia fecal ovina de la oveja 7120 LE son esperables ante infecciones naturales en ovinos por especies de *Campylobacter* (Ogden et al., 2009). Existen estudios moleculares sobre detección y cuantificación de *C. jejuni* en aves y cerdos directamente a partir de muestras fecales (Rudi et al., 2005; Leblanc-Maridor et al., 2011). Sin embargo, en ovinos las cantidades medias esperadas son diferentes, así como las características de la materia fecal (Ogden et al., 2009). En el ensayo realizado en cerdos, el límite inferior de detección para muestras fecales fue de 10 copias y se pudo cuantificar hasta $2,5 \times 10^2$ UFC/g de materia fecal (Leblanc-Maridor et al., 2011). Para el caso del estudio realizado en aves, los límites de detección fueron entre 2 y 25 UFC y un rango de $>4 \log_{10}$ (Rudi et al., 2005). El contenido estimado de *C. jejuni* en el ciego de aves varía entre 6 a $8 \log_{10}$ UFC/g (Rudi et al., 2005). Por otra parte, en cerdos el contenido fecal contiene entre 10^2 a 10^7 UFC de *Campylobacter*/g y la especie

predominante es *C. coli*. Se estima que existe entre 10 a 100 veces menos *C. jejuni* que *C. coli* (Leblanc-Maridor et al., 2011). Las referencias utilizadas por los autores varían en cuanto a si la cantidad expresada es encontrada en el ciego u heces. Según Ogden et al. (2009), en pollos se espera encontrar 10^2 UFC/g y en cerdos 3×10^4 UFC/g de *C. jejuni* y *C. coli* en materia fecal. Teniendo en cuenta estos valores y los que estiman estos autores para ovinos (2×10^5 UFC/g), es razonable pensar que, a pesar de que nuestro límite de detección fue de 274 copias/reacción, se espera una mayor cantidad de *C. coli* y *C. jejuni* en esta última especie animal. Por lo tanto, este valor sería apropiado para detectar *C. jejuni* en esta especie, si las cantidades representan los valores estimados reales en nuestras condiciones de producción. Vondrakova et al. (2014) obtuvieron un límite de detección de 6,62-16,10 copias/reacción para *C. jejuni* en su ensayo el cual es menor que el nuestro de 274 copias/reacción. Se debe tener en cuenta que la matriz alimenticia usada probablemente disminuya la sensibilidad de la PCR en menor medida que la materia fecal ovina. Por otra parte, la eficiencia obtenida por estos autores fue de 90,85% mientras que para nuestro ensayo fue 97,6 % con el kit comercial. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron adecuados lo cual garantizó la calidad de los resultados.

En condiciones óptimas, la diferencia en Ct (Δ Ct) entre dos diluciones seriadas en base 10 debió ser 3,3 y con un 100% de eficiencia de amplificación (Svec et al., 2015). En este ensayo, las eficiencias superiores a 100% correspondieron a aquellas realizadas con el método de extracción de *Fast Boiling Preparation*. Esto sugiere que este método de extracción es en cierta medida menos efectivo en la eliminación de compuestos inhibidores que el método comercial.

La sensibilidad se vio afectada y se evidenció mediante el aumento del Ct (se requirió un mayor número de ciclos para cruzar el umbral de detección) en comparación con las extracciones realizadas con el kit comercial. Una de las formas de disminuir esto es realizar la dilución de la muestra (Cook & Britt, 2007; Flagstad et al., 1999; Trochimchuk et al., 2003). Esto concordó con lo observado en las diluciones 1:5 de las extracciones realizadas con el método *Fast Boiling Preparation*. En este caso, la eficiencia fue más cercana al 100% que cuando se utilizaron las extracciones sin diluir.

Igualmente, ambos métodos de extracción obtuvieron el mismo rango dinámico para detección de *C. jejuni*.

Por otra parte, todas las muestras de campo de los predios 1a y 1b resultaron sin presencia de *C. jejuni* al momento de los muestreos. Este hallazgo es de suma importancia porque en los Estados Unidos se encuentra dentro de las principales causas de abortos en pequeños rumiantes y se ha reconocido a un clon particular de *C. jejuni* como el principal causante de aborto en ovinos (APHIS, 2014; Sahin et al., 2008; Mou et al., 2015). Recientemente se ha estudiado la asociación de las cepas abortigénicas ovinas con las que causan enfermedad gastrointestinal en humanos. Se utilizó la tecnología de *Pacific Biosciences' Single Molecule, Real-Time* para explorar los patrones de metilación en el genoma de las cepas. Se observaron diferencias en estos patrones por lo que se hipotetiza que la presentación diferencial de cepas humanas y abortigénicas ovinas podría deberse a esto (Mao et al., 2015). Además, dentro de las especies de *Campylobacter*, *C. jejuni* es la principal causante de infecciones en humanos (Liu et al., 2017; Hansson et al., 2020). También está asociado a la posibilidad de contaminación de fuentes de agua (Stanley & Jones, 2003). Por otra parte, se reconoce a *C. jejuni* como el patógeno entérico con mayores diferencias entre cepas en cuanto a los patrones de patogenicidad (Hofreuter et al., 2006).

Este resultado se debe analizar teniendo en cuenta el ciclo de las *Campylobacter* en sus hospederos y el sitio de toma de muestra. A pesar de que no se encontró *C. jejuni* en la materia fecal de las hembras de los predios 1a y 1b, no se puede afirmar que las mismas no las presentaban a nivel intestinal. Uno de los factores que afecta la detección y el aislamiento de *Campylobacter*, es el sitio de muestreo en el animal. Por lo general, los hallazgos de *Campylobacter* a partir de muestras intestinales supera ampliamente a las muestras fecales. Las muestras fecales pueden ser un indicador de colonización reciente, pero con estas muestras puede subestimarse la verdadera proporción de animales que portan a nivel de intestino (Jones & Wallace, 1999; Stanley & Jones, 2003). Sin embargo, un estudio realizado recientemente en un tambo en vacunos lecheros determinó que la muestra más adecuada para aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes como *C. jejuni* en animales vivos eran las muestras fecales (Hansson et al., 2020). Por lo tanto,

consideramos que en nuestras condiciones la toma de muestra de materia fecal, extracción de ADN por el método de *Fast Boiling Preparation* y técnicas moleculares como la qPCR descrita por Vondrakova et al. (2014) es una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica. Además, este tipo de muestras no invasivas son adecuadas para el estudio de animales vivos.

8.2.3 PCR para detección de especies de *Campylobacter*

La PCR a tiempo final con los cebadores diseñados por Linton et al. (1996) demostró ser capaz de detectar todas las diluciones seriadas de *C. jejuni* utilizadas para contaminar materia fecal de la oveja 7120 La Estanzuela. Esta muestra sin contaminar fue negativa a la qPCR para detección de *C. jejuni* pero produjo un amplicón para detección de *Campylobacter* spp. De acuerdo con esto, se presumió que la materia fecal de la oveja 7120 La Estanzuela poseía una cantidad muy baja de *Campylobacter* y que la/s especie/s presente/s no incluía/n a *C. jejuni*.

La sensibilidad analítica de un ensayo molecular para un microorganismo depende primariamente de tres factores: las condiciones fisicoquímicas de la reacción, la concentración y naturaleza del ADN diana y la selección de cebadores y sonda (Bastien et al., 2008). El límite inferior de detección de este ensayo fue de 137 copias/reacción y se consideró apropiado de acuerdo con las cantidades esperadas a detectar en ovinos (Kralik & Ricchi, 2017; Ogden et al., 2009)

Stanley y sus colaboradores fueron los principales autores que comenzaron trabajado con *Campylobacter* spp. en microbiota de ovinos. Sus trabajos se basan en cultivo y recuento en placa, aunque no se realizó seguimiento individualizado de animales en dichos estudios (Linton et al., 1996; Owen et al., 1995; Stanley & Jones, 2003). Si bien la comparación directa de técnicas moleculares con cultivo resulta engorrosa y el diseño experimental no fue similar, resulta una referencia valiosa. Se observa que, si se utiliza como referencia las UFC de *C. jejuni* por gramo de materia fecal utilizadas para contaminar la materia fecal y se compara con los resultados de *Campylobacter* spp. de Stanley y Jones (2003) (ovejas periparto 10^5 UFC/g, parto 10-100 UFC/g), Stanley et

al. (1998) (media 10^4 UFC/g), Odgen et al. (2009) (moda 2×10^5 y media: 7×10^4 - 4×10^5 UFC/g), todos los valores quedan comprendidos dentro del rango de detección de nuestro ensayo. Esto es importante ya que indica que las técnicas que se utilizaron permitirían detectar las cantidades descritas por dichos autores. Sin embargo, no existen referencias específicas de cantidades de *C. jejuni* en ovinos por lo tanto se utilizaron las de *Campylobacter* spp.

8.2.4 Purificación de productos de PCR y secuenciación

Como se mencionó previamente, la extracción de ADN de la materia fecal sin contaminar de la oveja 7120 La Estanzuela produjo un amplicón producto de la PCR diseñada por Linton et al. (1996). Por este motivo se sospechó que la materia contenía alguna especie de *Campylobacter*. La secuencia del amplicón resultante de la muestra “kit-1j” (muestra fecal a la que se agregó una dilución -1 de *C. jejuni* y extraída con kit) mostró una alta similitud con *C. jejuni*. Se sospechó que poseía otra especie de *Campylobacter* aparte de *C. jejuni*. Para visualizar y diferenciar los distintos amplicones se podría en futuros estudios clonar o realizar secuenciación de nueva generación (NGS).

Se detectó *C. lanienae* como única especie de *Campylobacter* en las muestras fecales de campo en la etapa 1 de este trabajo. Esta especie se aisló por primera vez en el 2000 a partir de muestras fecales de dos trabajadores en Suiza (Logan et al., 2000). En el 2009 se la identificó por primera vez en una persona con enteritis en Canadá y recientemente se reportó en Alemania (Lévesque et al., 2016; Fornefett et al., 2021). Esta especie se aisló en cerdos y jabalíes en Japón, Hungría, Corea y Estados Unidos (Sasaki et al., 2003, 2013; Schweitzer et al., 2011; Shin & Lee, 2009; Jay-Russell et al., 2012). También se aisló de rumiantes salvajes y ovejas en España (Carbonero et al., 2014; Navarro-González et al., 2014; Oporto & Hurtado, 2011), y de ovejas en Turquía (Acik et al., 2013). También se identificó en Alberta (Canadá) en ganado de engorde a corral (Inglis et al., 2003, 2004, 2005) y se la describió como microbiota comensal. Sin embargo, dados los reportes humanos de los últimos años es probable que esta especie sea zoonótica (Fornefett et al., 2021). En nuestro país no se encontraron casos publicados asociados a *C. lanienae* ni tampoco detección en animales de producción (Mota et al., 2010; Notejane

et al., 2015). Sin embargo, es escasa la información disponible en el país acerca de las especies de *Campylobacter* involucradas en casos de gastroenteritis humanas, por lo que serían necesarios más estudios.

8.2.5 Análisis estadístico de proporciones y cálculo muestral

En la primera etapa del trabajo, los predios representan categorías diferentes (1a borregas y 1b ovejas). La proporción de animales con presencia de *Campylobacter* en el predio 1a fue de 0,79 y para el predio 1b de 0,047. La prueba de comparación de proporciones entre estas dos muestras independientes fue altamente significativa ($p < 0,05$). Los resultados encontrados coinciden con otros estudios donde se detectan diferencias entre categorías, así como en la segunda etapa de este ensayo (figuras 12 y 13) (Stanley et al., 1998; Grau 1991; APHIS, 2014). El muestreo independiente entre predios cuyos animales muestreados representaban una categoría se realizó de esta forma debido a que, para realizar el cálculo muestral para detectar diferencias entre proporciones, las muestras deben tomarse de muestras independientes (Connor, 1987).

Los supuestos de la prueba de comparación de proporciones fueron violados ($n < 5$, n representa número de observaciones y p , proporción). Esto se debió a la proporción extremadamente baja del predio 1b. Se empleó para el cálculo muestral una proporción estimada de 0,25 para este predio. Esta proporción fue la obtenida en el ensayo realizado por Odgen et al. (2009) basado en 292 muestras fecales en Reino Unido. Es importante ser conservador y prudente con los estimados de modo de no sobrevalorar un efecto y correr el riesgo de calcular un número insuficiente de participantes por muestra, lo cual condiciona la validez interna y externa del estudio (Faber & Fonseca, 2014; Patino & Ferreira, 2016). Es por este motivo, que se utilizó en el cálculo muestral una proporción estimada de 0,25 en lugar de 0,047.

Se estableció una potencia del 80% y un nivel de significancia de 0,05. La potencia se define como la probabilidad de obtener un resultado estadísticamente significativo cuando existe una diferencia real entre dos tratamientos en ensayos clínicos aleatorizados.

Por lo general, se utiliza una potencia de al menos 80% de modo de asegurar una alta probabilidad de observar un efecto y fue la que se utilizó en este ensayo. Una de las formas de aumentar la potencia de una prueba es aumentar el tamaño muestral (Patino & Ferreira, 2016). En este caso particular, existió fuerte evidencia que sugería que la proporción de borregas excretando *Campylobacter* spp. era mayor que la encontrada en ovejas. Por esta razón, se optó por que el cálculo muestral se realizara con hipótesis unilateral. Las pruebas unilaterales poseen más potencia que las bilaterales y requieren un menor número de participantes para detectar diferencias entre grupos (Lakens, 2016).

El número necesario de participantes a reclutar para detectar diferencias entre proporciones fue de 19 individuos por grupo. Efectivamente este número permitió detectar diferencias entre categorías en las pruebas de proporciones realizadas.

El cálculo presentó varias dificultades como la ausencia de estudios similares en nuestro país y en la región, la gran variabilidad en los resultados obtenidos en estudios realizados en otros lugares (Jones et al., 1999; Kudva et al., 1997; Stanley et al., 2003), la excreción intermitente de *Campylobacter* spp. descrita en ovinos (Stanley et al., 2003; Sproston et al., 2011) y el diseño longitudinal del ensayo posterior. Por este motivo, se utilizaron todos los recursos de modo de aumentar el tamaño de la muestra. A mayor diferencia en el efecto esperado entre dos grupos, más pequeño es el tamaño de muestra necesario para visualizar ese efecto (Patino & Ferreira, 2016). Otra forma de realizar el cálculo muestral pudo haber sido aquella que tuvo en consideración que las observaciones iban a ser repetidas en el tiempo (Guo et al., 2013). Sin embargo, consideramos que el método empleado fue el más adecuado para un primer estudio en nuestro país.

8.3 Etapa 2. Estudio longitudinal en tiempos fijos de muestreo de la excreción de *Campylobacter* spp. a lo largo del ciclo reproductivo en ovejas y borregas

8.3.1 Aptitud reproductiva aparente, conformación de grupos en cada establecimiento y servicio

Las hembras de ambas categorías tenían ARA e iban a ser servidas en las mismas condiciones dentro de cada predio. El cálculo muestral realizado en la etapa 1 resultó en que se requerían 19 borregas y 19 ovejas para poder detectar diferencias en proporciones. Se tuvo la posibilidad de sumar un segundo predio lo que permitió duplicar el tamaño de muestra total. Esto resultó adecuado debido a la naturaleza intermitente de excreción fecal de *Campylobacter* en rumiantes y permitió comparar además de categorías, predios, y obtener más confianza en los resultados. Se previó que un 10% de las hembras por muestreo no presentaran materia fecal al momento de la toma de muestra y para que no decayera la potencia excesivamente se aumentó el tamaño muestral total (Patino & Ferreira, 2016). Esto fue adecuado ya que en 11 y 12% de las muestras no pudieron obtenerse para los predios 2a y 2b, respectivamente.

8.3.2 Muestreo fecal, ecografía y condición corporal

Los estudios de cohorte consisten en estudios observacionales en los cuales se monitorea una población en el tiempo. Típicamente se arman dos grupos: uno de los grupos es expuesto a una condición y el otro es un grupo de referencia o control (Haine et al., 2018). En este caso, se tomó como condición diferencial entre los grupos la categoría animal y se monitoreó la excreción de *Campylobacter* para abordar la hipótesis planteada. De acuerdo con las ecografías, fecha de monta y día del parto se calcularon los días de gestación que tenía cada hembra en cada muestreo.

La CC es una de las variables que se registró por su facilidad de lectura y su importancia como indicador de salud animal y adecuado estado nutricional. Su lectura es una importante medida de manejo para optimizar la eficiencia reproductiva a nivel de establecimientos. Es una técnica subjetiva descrita por Jefferies en 1961 que posee una

escala de 5 grados, pero se pueden adjudicar puntajes intermedios (SUL, 2018). Se ha establecido que las distorsiones metabólicas perturban el equilibrio de la microbiota y por este motivo podrían alterar los resultados de excreción de *Campylobacter* (Couderc, 2007; Hernández et al., 2014; Fanning, 2016). Por lo tanto, dado que una CC deficiente o excesiva podría haber afectado los resultados obtenidos en este ensayo, se tuvo como objetivo en este estudio monitorear animales cuya CC fuera adecuada según su estado fisiológico, y de este modo poder conocer los cambios en la excreción de *Campylobacter* en animales sanos a lo largo de la gestación en las condiciones de producción de los predios estudiados. Se usó el mismo criterio de lectura y los mismos datos de CC que para el proyecto ANII- FCE_3_2018_1_148540 Proyecto de investigación Fundamental Fondo Clemente Estable “Cuantificación de pérdidas embrionarias y fetales en majadas de Uruguay y diagnóstico de agentes infecciosos involucrados”. El entrenamiento de la lectura se realizó con el encargado del predio 2b y se efectuó la lectura con una sensibilidad de 0,25 puntos. El entrenamiento recibido por parte de una persona con experiencia fue un punto importante e hizo que la lectura en el predio 2a fuera realizada con el mismo criterio que en las hembras del predio 2b (Kenyon et al., 2014).

Los resultados obtenidos de CC fueron muy cercanos a los recomendados por el SUL. En una revisión realizada en 2014 se revisan los principales estudios que demuestran el efecto de la condición corporal de los ovinos a lo largo del ciclo reproductivo y su impacto en la ovulación, tasa de preñez, sobrevivencia de corderos, entre otros (Kenyon et al., 2014). Los resultados obtenidos en nuestro ensayo también coinciden con las necesidades fisiológicas mínimas reportadas en la revisión de modo de optimizar el ciclo reproductivo. Esto es de fundamental importancia desde el punto de vista económico y también garantiza que se están cumpliendo con estándares de bienestar animal.

Los datos recabados de ecografía, registro de monta y fecha de parición permitieron estimar los días de gestación que tenía cada hembra en cada muestreo prefijado. Al tener varias fuentes de información para determinar una misma variable (días de gestación) se tuvo más certeza en la estimación de los días en cada tiempo de muestreo. La proximidad al parto podría ser un factor asociado a la eliminación fecal de

Campylobacter (Kudva et al., 1997; Stanley et al., 2003; Mawdsley et al., 1995; Jones et al., 1999). Sin embargo, en nuestro estudio la proximidad al parto (en T₄) se asoció a la eliminación de *Campylobacter* spp. solamente en la categoría ovejas del predio 2b (figura 13). Se debe tener en consideración que en T₄ existían ovejas paridas y por parir.

8.3.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio

El procesamiento en el laboratorio se hizo de acuerdo con la forma pautada y se estandarizó la metodología. La técnica de extracción de ADN *Fast Boiling Preparation* se puso a punto y el control de extracción de ADN se realizó a todas las muestras de campo, de modo de que produjeron un amplicón específico. Luego de la realización del control de extracción con la PCR que amplifica el gen 16S de archaeas y bacterias en general, se realizó la PCR diseñada por Linton et al. (1996). El procedimiento en sí fue rápido, económico y demostró ser eficaz para la detección de especies de *Campylobacter* a partir de materia fecal ovina. 9 de las 11 muestras secuenciadas al azar tuvieron alta similitud con *C. lanienae* como en la etapa 1. Este resultado sugiere que esta especie es la mayoritaria en los ovinos muestreados. El porcentaje de muestras secuenciadas representó un 3,2 % de las muestras totales de la segunda etapa. La metodología utilizada en nuestro ensayo fue similar a la que se empleó para el estudio que describió por primera vez *C. lanienae*. Este estudio en primera instancia tuvo como objetivo un control de rutina de trabajadores de un frigorífico (Logan et al., 2000).

8.3.4 Patrones de excreción de *Campylobacter* spp.

La excreción de *Campylobacter* se ha descrito como intermitente en varias especies incluida la ovina (Duncan et al., 2014; Stanley & Jones, 2003). Similarmente en este ensayo el análisis de patrones de excreción indicó intermitencia. Se obtuvo una diferencia de proporción de hembras que presentaron excreción no consecutiva significativa ($p < 0,05$) entre predios (una diferencia en proporción del 0.18 entre predio 2a y 2b) lo cual lleva a hipotetizar que estos patrones podrían explicar diferencias observadas entre los predios (tablas 6 y 8) y podría estar relacionado a los diferentes picos

de excreción que se discuten más adelante. Los patrones de excreción diferentes entre predios pueden estar relacionados a varias causas e hipótesis.

Stanley y Jones (2003) hipotetizaron que la excreción de *Campylobacter* spp. en materia fecal puede ser un indicador de contaminación reciente lo cual puede estar asociado a mayor contaminación de la pastura. Sin embargo, los autores discuten si en realidad los animales se reinfectan durante su vida o si existe recrudescencia de las poblaciones propias en el intestino. Este concepto no se volvió a discutir en publicaciones más recientes, pero en parte explica los cambios asociados a la progresión de gestación que se observó en el predio 2b en ovejas. En T₄ (muestreo más próximo al parto, edad gestacional representada en figura 10) se identificó que el OR calculado para la interacción entre gestación*predio fue significativa (OR= 1,21; P= 0,019 IC 95% 1,03-1,43). Los cambios hormonales propios de la gestación podrían en parte explicar la eventual recrudescencia que menciona Stanley et al. No se encontraron estudios recientes que explicaran el fenómeno de aumento de excreción de microorganismos en ovinos próximo al parto. En una revisión recientemente publicada se remarca el estrés asociado al parto como desencadenante (Rukambile et al., 2019). Un estudio en vacas lecheras concluyó que existen varios factores que determinan los cambios del microbioma fecal a medida que se aproxima el parto. Este estudio se basa en *Salmonella* y describen a la gestación y al predio como algunos de los factores (Muñoz-Vargas et al., 2018).

Odgen et al. (2002) describieron ovinos que eliminan fecalmente altas cargas de *Campylobacter*. Según los autores, estos animales son los principales responsables de la transmisión horizontal dentro de una majada. En este estudio no se realizó cuantificación de la excreción de *Campylobacter* y se desconoce si este fenómeno de alta excreción tiene un efecto similar que para *E. coli*. Sánchez et al. (2009) describieron la persistencia de ovejas que excretaban clones específicos de *E. coli* productora de toxina Shiga. De ser así, la contribución de estos animales definidos como aquellos que excretan más de 10⁵ *E. coli* por gramo de materia fecal afectaría al resto de los animales que pastorean conjuntamente. En este caso, la pastura permanecería más tiempo contaminada cuando los patógenos son eliminados en mayor cantidad y esto podría determinar diferencias en los patrones de excreción de otros ovinos de la misma majada (Odgen et al., 2002; Stanley & Jones, 2003). Inglis et al. (2004) por otra parte, describieron novillos excretores crónicos de *Campylobacter*, en base a la continuidad de la excreción. Si bien estas

definiciones presentadas parecen diferentes, es probable que sean complementarias. En el caso de aquellas ovejas que se identificaron excretando en un número elevado de muestreos, pueden éstas ser candidatas a ser excretoras crónicas según la definición de Inglis et al. y tal vez su excreción fuese lo suficientemente importante como para ser consideradas altas excretoras según la definición de Stanley et al. Tomando en cuenta estos estudios y los resultados de esta tesis, se podría ahondar en determinar un criterio para establecer cuáles animales en nuestras condiciones son considerados excretores crónicos y/o altos excretores dados nuestros resultados en futuros estudios longitudinales con cuantificación.

Finalmente, el rol de otras especies animales en la contribución de la contaminación de la pastura como los bovinos es otro factor que podría contribuir en las diferencias observadas en los patrones de excreción entre los predios (Duncan et al., 2014; Sproston et al., 2011). En el predio 2a el pastoreo con bovinos fue continuo y en el 2b ocasional. La contribución de los mismos a la contaminación ambiental de la pastura no fue tomada en cuenta ni tampoco la de aves y roedores que han sido otras especies descritas como contribuyentes importantes (Stanley & Jones, 2003; Stanley et al., 1998).

8.3.5 Análisis de factores asociados a excreción de *Campylobacter* en el contexto del diseño experimental

Con respecto al diseño experimental realizado se lo contextualiza en un marco teórico y se discute los resultados de las regresiones, la interpretación gráfica y las características de los factores que actuaron durante el ensayo. En esta discusión se debe tener en cuenta que no se probaron los supuestos de las regresiones realizadas a partir de modelos saturados. Los tres tipos de estudios epidemiológicos que permiten determinar factores asociados a una condición son: observacionales, de cohorte o caso-control (Balkau et al., 1995). En este caso, se realizó un estudio donde se reclutaron hembras con ARA y se las siguió en el tiempo. Se evaluó la presencia de *Campylobacter* spp. en su materia fecal para probar la hipótesis de investigación. Este estudio tuvo características de un diseño de cohorte en el sentido de que se siguió a una muestra de animales en el tiempo. La palabra cohorte proviene de su raíz en latín que se refiere a grupos de sujetos que presentan una característica en común. En diseños epidemiológicos, la característica de interés es la exposición. Por lo general, la selección de grupo de estudio se basa en el

estado de exposición (un grupo con exposición, otro sin). Sin embargo, se puede seleccionar un solo grupo que se considere que el estatus con respecto a la exposición sea heterogéneo y luego determinar su estado de exposición. Esto se denomina estudios de cohorte únicos o longitudinales. Si existe suficiente conocimiento acerca de la biología, se debería considerar cuánta exposición es necesaria para desencadenar un efecto y qué tanto tiempo después que el umbral de exposición es alcanzado es necesario para desencadenar la enfermedad clínica (período de inducción). En el caso de *Campylobacter* spp. se conoce que el primer contagio se da enseguida del parto y que dura a lo largo de toda la vida, se discute si en realidad los animales se reinfectan durante su vida o si existe recrudescencia de las poblaciones propias en el intestino (Stanley & Jones, 2003). Por otra parte, en condiciones de engorde a corral en vacunos, se comprobó que ocurre transmisión horizontal de *C. jejuni* entre animales (Besser et al., 2005). Por este motivo, es altamente probable que ocurra algo similar en ovinos y la recrudescencia y transmisión horizontal ocurran en simultáneo. Al elegir los dos grupos a seguir en un ensayo, es deseable que los mismos pertenezcan a la misma población, como es el caso de las borregas y ovejas reclutadas (Dohoo et al., 2009).

En estos estudios, el objetivo es identificar consecuencias provocadas por un factor. La exposición se refiere a cualquier causa potencial de enfermedad que puede variar desde un agente infeccioso, agentes inocuos, modo de estabulación, dieta o condición como edad o sexo. El estado de exposición se puede medir en una escala dicotómica (expuesto/no expuesto), escala ordinal (muy baja, baja, media, alta), o continua (organismos por g de materia fecal). La exposición también se puede expresar en términos de dosis o duración o una combinación de ambos. Puede ser permanente o cambiar en el tiempo (Dohoo et al., 2009). En nuestro estudio, el desenlace de interés fue ausencia o presencia de *Campylobacter* spp. en materia fecal. Se utilizaron modelos de regresión logística por la característica dicotómica de este dato para desglosar la compleja relación que existe entre los factores que actúan. La categoría se midió en escala dicotómica (borrega/oveja) y fue el principal factor de exposición. Las otras variables se evaluaron como modificadores de efecto o confusoras de la relación entre la variable principal y el desenlace. La CC se determinó en una escala ordinal, pero se analizó como continua en los modelos de regresión. El predio fue otra variable dicotómica que caracterizó a los predios en 2a y 2b. Por otra parte, días de gestación es un dato numérico

discreto que en T₄ se la consideró una variable principal junto con categoría y en los otros tiempos de muestreo se la evaluó como modificador de efecto o confusor.

Para cualquier evento de un factor donde la exposición presenta un umbral o dosificación, la cantidad de exposición necesaria para categorizar un individuo como “expuesto” debe ser claramente establecida (Dohoo et al., 2009). En este ensayo en particular, se definió como exposición permanente a la categoría y el predio y como exposición única a la esquila. Dentro de los factores de exposición que variaron en el tiempo se encuentran la preñez y la dieta. No se determinó con exactitud la densidad de animales por unidad de superficie. Se presenta un diagrama en la figura 23 de los factores que actuaron en un marco conceptual basado en Dohoo et al. (2009). Dentro de cada predio, los dos grupos (borregas y ovejas) pertenecían a la misma majada. Esto fue importante ya que compartían muchas características en común.

En estudios de cohorte, la respuesta es medida como incidencia. Esto se hace cuando se parte de animales que se reclutan con el criterio de no presentar la respuesta al inicio del estudio. En este caso, se tuvo en cuenta la ARA para conformar los grupos, los animales no presentaban síntomas clínicos de enfermedad. Era inviable reclutar animales que no poseían *Campylobacter* spp., ya que estos pertenecen a la microbiota intestinal y su excreción es intermitente similarmente a lo que se describió para *E. coli* y *Salmonella* spp. (y muchos otros agentes) en varias especies animales (Robinson et al., 2004; Lahodny et al., 2017).

El conocimiento acerca de los factores asociados a la excreción fecal de especies de *Campylobacter* ha sido estudiado en varias especies. Mayormente esta tarea se ha realizado en aves por estar muy asociadas a la enfermedad clínica en humanos (OIE, 2018). Sin embargo, se ha reconocido que fuentes no aviares como los rumiantes estuvieron asociadas a casos humanos (Stanley & Jones, 2003; Mughini Gras et al., 2012; Ravel et al., 2016).

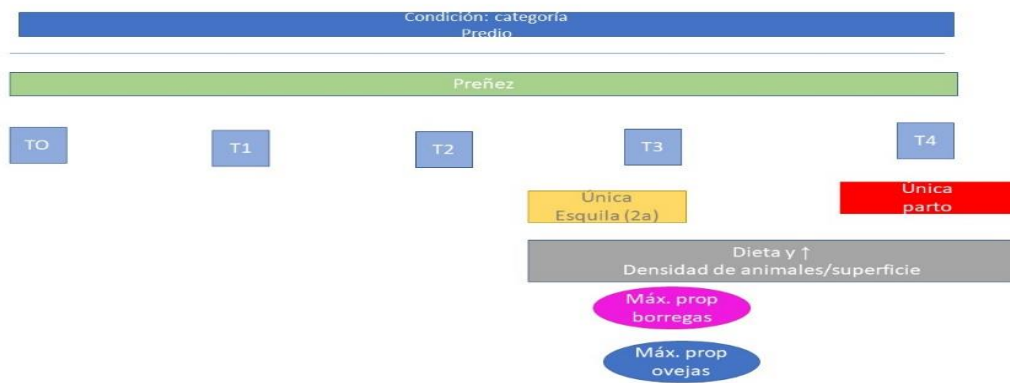
A pesar de esto, aún existen muy pocos estudios en rumiantes que describan factores asociados a la excreción y se requiere más conocimiento en este tema para poder poner en marcha directivas de salud pública y medidas de control. Varios estudios se han planteado determinar los factores asociados a la colonización de *Campylobacter* en aves. Para lograr este objetivo similarmente a lo que realizamos en nuestro estudio, se exploraron los posibles factores asociados utilizando modelos de regresión. A nivel de granja, factores tales como presencia de otras especies animales, proximidad de otras granjas de pollos, tratamiento de efluentes, cantidad de aves en producción, agua de bebida, temperatura ambiental, mes de faena y pluviometría han sido asociados (Guerin et al., 2007; Rushton et al., 2009). Un estudio de pequeños predios estimó la prevalencia de especies de *Campylobacter* a nivel fecal y encontró que el tamaño de la granja, la presencia de suinos y la estación del año estaban asociados con la misma (Pires et al., 2019).

En esta discusión se planteó un análisis de los factores asociados utilizando modelos de regresión y comparando los picos de excreción con un marco conceptual de factores como describe Dohoo et al. (2009). Este marco resulta apropiado ya que desglosa y conceptualiza a los factores y manifiesta la complejidad que existe para explicar la excreción de *Campylobacter* en rumiantes (Dohoo et al., 2009). Por otra parte, no existen estudios recientes en ovinos con un diseño experimental similar de modo de comparar los resultados obtenidos.

A



B



C



(adaptado de Dohoo, et al., 2009)

Figura 23. Diagrama de factores permanentes y que cambiaron en el tiempo por predio y picos de máxima excreción de *Campylobacter*. A) factores B) predio 2a, C) predio 2b

El análisis gráfico, de pruebas de proporciones y los modelos de regresión fueron complementarios entre sí y coincidieron en las conclusiones. Es probable que la prueba de proporciones haya sido, de estos tres análisis, la menos útil ya que se violaron los supuestos. Igualmente, es una prueba que en primera instancia permitió evaluar diferencias entre categorías de una forma más clásica. La representación gráfica observada en las figuras 12, 13, 14 y 15 y los modelos de regresión (que se construyeron a partir de modelos saturados evaluando interacción, modificación de efecto y factores de confusión) permitieron comprender la complejidad de las diferencias observadas entre categorías y la asociación con la excreción de *Campylobacter* spp. en un momento dado. Los modelos de regresión permiten tener en cuenta varias variables para asociarlas a un desenlace de interés. Se utilizó como principal predictor la variable categoría como variable explicativa de la excreción de *Campylobacter* spp. en un momento dado como se planteó en la hipótesis. Sin embargo, a partir de T₃ se observó que otras variables e interacciones entre variables se asociaban a la excreción.

La modificación de efecto se define cuando una exposición tiene diferentes efectos en diferentes subgrupos de pacientes cuyas características son diferentes. La misma está asociada con el desenlace pero no con la exposición en sí (Kotecha, 2015; Vander Weele, 2012).

La confusión ocurre cuando una relación aparentemente causal entre una exposición y un desenlace es en realidad distorsionada por el efecto de una tercera variable (confusora). Los efectos de confusión son especialmente relevantes en estudios observacionales. Por definición los factores de confusión deben cumplir tres criterios: 1) deben estar relacionados a la exposición y al desenlace, 2) deben estar distribuidos de forma no uniforme entre los grupos de estudio, y 3) no deben ser un paso intermedio en el diagrama de causalidad entre exposición y desenlace (Meuli & Dick, 2018). Se evaluó siempre el efecto de modificación u interacción y en caso de que no existiera, se prosiguió al análisis de factores de confusión.

En T₀ (muestreo inicial), la categoría fue el principal factor que se asoció a la excreción de *Campylobacter* spp. Esto coincidió con que en ambos predios la proporción

de borregas que excretaron *Campylobacter* spp. fue mayor que la proporción de ovejas y que las proporciones fueron similares para ambos predios. El OR para categoría fue 0,218 (IC 95% 0,04-1,13), indicando que pertenecer a la categoría oveja fue un factor protector de la excreción de *Campylobacter* spp. Al comparar este resultado con el marco teórico de los factores, se observa que la categoría, que es un factor que actúa a lo largo de todo el ensayo, es el factor más importante y que en esta etapa solamente el predio y la categoría actuaron.

Similarmente, en T₁ (segundo muestreo), se observó gráficamente que no se detectaron ovejas en los predios 2a y 2b que excretaran *Campylobacter* spp. (figura 15). Por otra parte, sí lo hacía una proporción de borregas en ambos predios (figura 14). Los modelos de regresión no pudieron evaluarse ya que pertenecer a la categoría oveja predecía a la perfección no eliminar *Campylobacter* spp. Por lo tanto, en este tiempo de muestreo se concluyó que la categoría oveja era un predictor de no excretar *Campylobacter* spp. Este resultado en el marco del diagrama de factores demuestra que la categoría es el factor más asociado a la excreción como sucedió en T₀.

Esto coincide con que existen referencias acerca de que en rumiantes las categorías más jóvenes son más susceptibles a que algunas especies de *Campylobacter* les ocasionen enfermedad clínica y que la proporción de animales excretando sea mayor que en animales adultos (Stanley et al., 1998; Grau 1988; APHIS 2014). En un estudio realizado en Estados Unidos en 2011, se observó que la proporción de muestras fecales individuales de las categorías jóvenes (corderos y recría de hembras) era mayor que hembras preñadas (0,169 y 0,087, respectivamente) (APHIS, 2014). En trabajos recientes se discute sobre el balance entre microbioma digestivo y fisiología del individuo. En el caso de animales jóvenes, como serían las borregas, los mecanismos de funcionamiento del microbioma no están estudiados exhaustivamente. Es probable que en estas categorías el sistema adaptativo de la microbiota no esté completamente desarrollado, y por ese motivo ante un evento de estrés desarrollen enfermedades clínicas (Cholewińska et al., 2021). Si bien en este ensayo no se detectó enfermedad clínica se observó una mayor proporción de borregas excretando las especies de interés en comparación con las ovejas.

En T₂ (tercer muestreo) el predio 2b presentaba mayor log odds de excreción que el predio 2a y dentro de cada predio las borregas presentaron mayor log odds que las ovejas. Contextualizando este resultado con respecto al marco teórico de factores, se observa que muy próximo a T₂ se llevó a cabo la esquila en el predio 2b. Igualmente se observa que este efecto solamente generó un pico de excreción en las borregas dentro del predio 2b. En el marco teórico de como actuaron los factores, la esquila preparto (factor que actuó en un momento específico) estuvo asociado a los picos máximos observados en el predio 2a para borregas y ovejas (que sucedió en T₃). Se ha descrito que el estrés térmico asociado a la esquila preparto, sumado al cambio de dieta pueda explicar los picos observados (Stanley & Jones, 2003). Recientemente se ha revelado cómo situaciones de estrés provocan una respuesta neuroendocrina que puede tener un efecto directo o indirecto sobre la microbiota digestiva. En estos casos, los marcadores inflamatorios pueden aumentar a pesar de la ausencia de infección. Esto favorece el riesgo de aparición de enfermedades causadas por agentes patogénicos (Cholewińska et al., 2021). Es probable que un mecanismo similar suceda y provoque alteración de la microbiota.

Los trabajos similares que hay realizados en este tema se originaron en el hemisferio norte (Reino Unido) donde no se realiza este tipo de manejo preparto. Se hipotetiza que por lo tanto no se observaron aumentos en la proporción de animales excretando *Campylobacter* spp. asociados a la esquila preparto (Duncan et al., 2014; Sproston et al., 2011). El comportamiento gregario que presentan los ovinos es manifiesto en nuestras condiciones de producción y en sistemas de estabulación este comportamiento es alterado. Estudios recientes han demostrado la relación de bienestar animal con alteración de la microbiota digestiva en ovinos (Cholewińska et al., 2021). Estos descubrimientos en parte pueden explicar las diferencias observadas entre este estudio y los del hemisferio norte.

En T₃ (cuarto muestreo), la modificación de efecto entre la categoría y el predio tuvo un OR muy importante (48,1; IC 95% 1,6-1447). A pesar de que se reconoce que es probable que los coeficientes calculados de la regresión sean inexactos, el efecto que mejor explica la excreción en este tiempo de muestreo es la modificación de efecto entre categoría y predio. Contextualizando estos resultados con el marco teórico de cómo actuaron los factores, se observa que en el predio 2a se llevó a cabo la esquila y que ambas

categorías respondieron con un pico de máxima excreción que coincidió a diferencia de lo que sucedió con el predio 2b. La esquila es un acontecimiento que dentro de los modelos de regresión estaría representado por el efecto cuantificado dentro de “predio” y que se discutió anteriormente. Se desconoce por qué razón las categorías respondieron de forma diferente. Se hipotetiza que otros factores que no se evaluaron pudieron estar relacionados a las diferencias observadas.

En T₄ (quinto muestreo), no se tuvieron en cuenta los datos de CC en los modelos de regresión realizados ya que en la preñez avanzada se presentan algunas dificultades para su determinación (Kenyon et al., 2014). La cercanía al parto como factor asociado a la excreción de *Campylobacter* spp. se vio en ovejas del predio 2b. Esto coincidió con lo expresado por Stanley y Jones (2003) que asociaron al parto como factor principal en ovejas. Es probable que este fenómeno esté asociado al manejo realizado en sistemas de Reino Unido como se discutió anteriormente. La categoría borrega en ambos predios y la categoría ovejas en el predio 2a habían tenido mayor proporción de animales eliminadores en muestreos previos a T₄. Es posible que debido al comportamiento de la bacteria en los animales en forma de pico y un rápido descenso, explique por qué no realizaron un pico nuevamente (Duncan et al., 2014). En este ensayo parece que esta categoría en el predio específico no generó el mismo efecto que en las borregas. Se detectó un efecto significativo de interacción entre predio y días de gestación (OR: 1,2; I.C 95% 1,0 – 1,4). Dentro de la variable predio existen varios componentes que se deben considerar: pastoreo con otras especies, densidad de animales por superficie, aporte nutricional, manejo sanitario, esquila preparto, características propias de los potreros y su agua de bebida, así como otras variables ambientales (clima, etc.) y ecológicas (fauna silvestre, etc.). Los datos de cantidad de animales por unidad de superficie en pastoreo fueron inexactos, en especial para el predio 2b y no se presentan. En ese predio se llevó a cabo una rotación de los animales por los lugares de pastoreo. En el caso del predio 2a, pastorearon 190 hembras ovinas con 40 vacunos (vaquillonas) en 100 hectáreas hasta la esquila, y post esquila las hembras ovinas pastorearon solas en 20 hectáreas de campo natural mejorado y pradera artificial. A pesar de que la dotación animal ha sido considerada un factor asociado a la excreción de *Campylobacter* en rumiantes, no fue posible obtener este dato con certeza. Este factor se representó en el marco conceptual de cómo actuaron los factores en el tiempo y está asociado al manejo que se realizó en los

dos predios después de la esquila preparto. Varios estudios evaluaron el efecto del aumento de la densidad de bovinos de carne en diferentes condiciones (Besser et al., 2005; Inglis et al., 2004; Inglis et al., 2003; Hannon et al., 2009).

En Uruguay hay dos registros publicados y uno no publicado de abortos ovinos por *Campylobacter* spp. Los dos primeros casos ocurrieron en 2017 en predios del departamento de Colonia, uno fue causado por *C. fetus fetus* (Giannitti et al., 2018; Dorsch et al., 2021) y el otro por una especie de *Campylobacter* no identificada definitivamente, pero distinta de *C. fetus*, que probablemente se trate de *C. jejuni* o, menos probablemente, de *C. hepaticus*, *C. coli* o *C. insulaenigrae* (Aráoz et al., 2018). El tercer caso, no publicado, ocurrió en 2020 en un predio del departamento de Río Negro, donde se registraron 4 fetos abortados por 2 ó 3 madres, en una majada de aproximadamente 220 ovejas. Durante el desarrollo de esta tesis tuvimos la oportunidad de visitar este predio poco tiempo después de ocurridos los abortos, para recolectar información epidemiológica y del sistema productivo. Hum et al. (2009) determinaron que la relación entre portador intestinal y la ocurrencia de aborto es poco conocida. En la visita pudimos observar que las condiciones productivas del predio eran muy diferentes a las de los predios 2a y 2b estudiados en esta tesis. El área destinada para la majada de cría eran 20 hectáreas para 220 ovejas Texel y la nutrición se basaba en pasturas artificiales con pastoreo rotativo en parcelas de 4 hectáreas (carga instantánea de 55 ovejas/hectárea). En el último tercio de la gestación la majada se suplementó con maíz en grano entero ofrecido en el suelo (sin comederos) y sin pesar. Esta suplementación en el suelo pudo haber determinado que los animales ingirieran granos de maíz contaminados con tierra o heces. Además, la suplementación de maíz sin pesar pudo haber determinado una sobrealimentación con eventual desarrollo de acidosis ruminal en la majada. En Reino Unido, Duncan et al. (2014) encontraron que había asociación entre presencia de *C. fetus* en la bosta y que la misma presentara rastros de granos no digeridos. Los autores hipotetizaron que la presencia de materia fecal en ese estado sugería una acidosis ruminal subaguda con una tendencia a detectar *C. fetus*. Si bien esto es una especulación, en parte coincide con lo observado en ganado bovino en condiciones de engorde a corral donde los animales están en riesgo de padecer acidosis ruminal (Couderc, 2007; Hernández et al., 2014; Fanning, 2016).

Además en el marco de esta tesis, en el procedimiento de poner a punto los métodos moleculares en muestras de campo de materia fecal en la etapa 1 del trabajo se probó una qPCR que detecta *C. fetus* (Iraola et al., 2016). Debido a la ausencia de muestras positivas en reiteradas corridas, se desestimó utilizar este método para todas las muestras de campo. Este resultado se confirmó con los resultados de secuenciación, en los que ninguna de las muestras secuenciadas tuvo identidad con *C. fetus*.

En resumen, la categoría fue el factor asociado más importante en T₀ y T₁ (durante la encarnerada y comienzo de la gestación). A partir de T₂ en adelante la complejidad de los factores aumentó asociada al factor predio, días de gestación e interacciones entre variables. Por lo tanto, la excreción de *Campylobacter* spp. a nivel fecal varió a lo largo de la gestación. Esto en parte coincide con la hipótesis planteada de que la categoría era el principal factor explicativo de la excreción de *Campylobacter* spp., así como la proximidad al parto en T₄. En más detalle, de acuerdo con el marco teórico utilizado, es probable que el efecto de la esquila sumado al aumento de la densidad animal y nutrición hayan estado asociados a los picos de excreción. Sin embargo, los mismos no se cuantificaron de forma independiente dentro de los modelos de regresión.

Para sacar conclusiones de si los resultados del presente estudio coinciden con otros estudios debemos tener en cuenta que la mayoría de los estudios longitudinales recientes de *Campylobacter* en ovinos no realizaron un seguimiento de los mismos animales, o se reportan datos a nivel de majada y no individuales (APHIS, 2014; Duncan et al., 2014; Sproston et al., 2011; Yang et al., 2014). A pesar de esto, las referencias más recientes que hay son Sproston et al. (2011) y Duncan et al. (2014) que describen al verano como factor explicativo de brotes estacionales de *Campylobacter*. Sproston et al. (2011) también asociaron una mayor excreción con características del predio. El enfoque realizado en este estudio es original, ya que otros estudios similares realizados no habían seguido los mismos animales en el tiempo.

9. CONCLUSIONES

El estudio permitió abordar un tema de importancia asociado a uno de los principales rubros del país como es la producción ovina, que representa además un problema de salud pública a nivel internacional y nacional. *Campylobacter* forma parte del microbioma intestinal de rumiantes y su epidemiología es compleja y en parte desconocida. El estudio de cohorte permitió observar y analizar los cambios en el tiempo en la proporción de animales excretores de *Campylobacter* a nivel individual, por categorías y dentro de cada predio.

Los procedimientos de laboratorio realizados en este estudio podrían ser utilizados para vigilancia epidemiológica de *Campylobacter* spp. en nuestro país, incluyendo especies zoonóticas y causales de enfermedades transmitidas por alimentos.

La excreción de *Campylobacter* spp. fue intermitente en los ovinos estudiados y se detectaron diferencias en patrones de excreción entre los predios. El estudio demostró que varios factores están asociados a la excreción de *Campylobacter* spp. por ovinos y que los mismos tienen un papel diferente según el tiempo de muestreo. La categoría fue el factor más trascendental en T_0 y T_1 y luego de T_2 , la complejidad de los factores aumentó asociada al factor predio, días de gestación e interacciones entre variables. Es probable que la esquila preparto, que se vio representada dentro de la variable “predio” en los modelos de regresión también haya tenido impacto en los picos de excreción.

La excreción fecal de *Campylobacter* spp. varió a lo largo de la gestación y coincidió con las hipótesis planteadas. La única categoría que realizó el pico de excreción próximo al parto fueron las ovejas, y esto sólo se vio en el predio 2b. Se desconocen las razones por las cuales en este predio las ovejas y borregas presentaron picos de máxima excreción en momentos diferentes, mientras que en el predio 2a coincidieron.

A partir de las muestras secuenciadas se identificó únicamente a *C. lanienae*. Esta es considerada una especie comensal, aunque recientemente se ha asociado a casos de gastroenteritis en humanos, por lo que su posible patogenicidad debería ser mejor estudiada.

No identificamos muestras fecales ovinas con presencia de *C. jejuni* ni *C. fetus*, importantes agentes zoonóticos abortigénicos en ovinos, aunque cabe considerar que una limitante de este estudio fue el bajo número de muestras y predios analizados. En los últimos años se ha vinculado a los rumiantes como importante fuente de contaminación para humanos y en nuestro país se ha reconocido a *Campylobacter* spp. en una proporción de casos diagnosticados de diarrea sanguinolenta en niños. Sin embargo, las fuentes de infección para humanos no han sido identificadas y merecen ser mejor estudiadas.

10. PERSPECTIVAS

A partir del presente estudio y sus resultados se plantea realizar un estudio secundario que cuantifique por qPCR la cantidad de *Campylobacter* spp. en las muestras de este estudio. Esta información sería complementaria a la presentada ya que permitiría identificar animales cuya carga de especies de *Campylobacter* sea alta. Se podría evaluar con qué nivel de excreción se consideraría a los animales altos excretores y si ese nivel es comparable a la clasificación que se hace para *E. coli* O157:H7. Detectar los individuos que eliminan altas cargas permitiría evaluar la posibilidad de aislarlos para evitar contaminación del ambiente y de otros animales. De esta forma se podría evaluar si retirar estos animales de la majada podría ser considerado un método para disminuir la transmisión. Poner a punto esto podría ser útil para posteriormente practicarlo en majadas con diagnóstico de aborto por *Campylobacter* spp.

Aumentar la cantidad de amplicones originados en este estudio que son sometidos a secuenciación podría determinar la identificación de un mayor número de especies de *Campylobacter* en las majadas estudiadas. Esto permitiría la identificación adicional de especies patógenas que infectan al ovino y que aún no se han identificado en esta especie en el país.

Finalmente, se considera integrar el diagnóstico en humanos con la investigación de los casos para evaluar posibles fuentes de infección y la eventual contribución de los animales de producción a casos humanos en nuestro país.

11. REFERENCIAS

- Acik, M.N., Karahan, M., Ongor, H., & Cetinkaya, B. (2013). Investigation of virulence and cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter* spp. isolated from sheep in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(7), 589–594.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1447>
- APHIS. (2014). *Campylobacter* on U.S. Sheep and Lamb Operations.
https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/sheep/downloads/sheep11/Sheep11_is_Campy_1.pdf
- Aragon. (2017). *epitools: Epidemiology Tools*. R (R package version 0.5-10).
<https://cran.r-project.org/package=epitools>
- Aráoz, V., Calleros, L., Barcellos, M., Monesiglio, C., Fraga, M., Caffarena, R.D., Macias-Rioseco, M., & Giannitti, F. (2018). Abortion caused by a *Campylobacter* sp. in a sheep in Colonia, Uruguay. *X Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinario*.
- Balkau, B., & Eschwege, E. (1995). Risk factors and their identification. First Part: What is a risk factor? *Diabete & Metabolisme*, 21(1), 69–75.
- Banchero, G., & Rivero, J. (2017). ¿Cuánto perdemos de la ecografía al frigorífico? *Taller de Diagnósticos de Gestación Ovina*.
<http://www.inia.uy/Documentos/Públicos/INIA La Estanzuela/2 Banchero - ovinos 08 2017.pdf>
- Bang, D.D., Pedersen, K., & Madsen, M. (2001). Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 9, 97–113.
- Barcellos, M. (2018). Diagnóstico y caracterización genética de *Campylobacter* en materia fecal de animales domésticos y silvestres de la región. [Universidad de la República].
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23228/1/uy24-18914.pdf>
- Bertamini, F., & Bervejillo, J. (2015). Producción ovina: análisis y perspectivas. *Cámara Mercantil de Productos Del País*.
http://www.camaramercantil.com.uy/uploads/cms_news_docs/Cadena Ovina anuario OPYPA 2015 .pdf
- Besser, T.E., Lejeune, J.T., Rice, D.H., Berg, J., Stilborn, R.P., Kaya, K., Bae, W., & Hancock, D.D. (2005). Increasing prevalence of *Campylobacter jejuni* in feedlot cattle through the feeding period. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5752–5758. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5752-5758.2005>
- Best, E.L., Powel, E.J., Swift, C., Kathleen, A.G., & Frost, J. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology*, 229, 237–241.

- Bhattacharyya, S. (2018). 'Logit' of Logistic Regression; Understanding the Fundamentals. <https://towardsdatascience.com/logit-of-logistic-regression-understanding-the-fundamentals-f384152a33d1>
- Calleros, L. (2015). Análisis de la variabilidad genética en *Campylobacter fetus*. [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/9060/1/uy24-17553.pdf>
- Carbonero, A., Paniagua, J., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Borge, C., & García-Bocanegra, I. (2014). *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), 115–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.001>
- Castro-Carrera, T., Toral, P.G., Frutos, P., McEwan, N.R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S.E., & Belenguer, A. (2014). Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1661–1669. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2013-7243>
- Champely. (2018). *pwr: Basic Functions for Power Analysis* (R package version 1.2-2). <https://cran.r-project.org/package=pwr>
- Chaveerach, P., ter Huurne, A.A.H.M., Lipman, L.J.A., & van Knapen, F. (2003). Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 711 LP – 714. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.711-714.2003>
- Cholewińska, P., Górniak, W., & Wojnarowski, K. (2021). Impact of selected environmental factors on microbiome of the digestive tract of ruminants. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 25–25. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02742-y>
- Connor R.J. (1987). Sample size for testing differences in proportions for the paired-sample design. *Biometrics*, 43(1), 207–211.
- Cook, K.L., & Britt, J.S. (2007). Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 154–160.
- Costa, D., Aráoz, V., Barcellos, M., Caffarena, R.D., Fraga, M., Giannitti, F., Monesiglio, C., Pérez, R., da Silva Silveira, C., & Calleros, L. (2020). Complete Genome Sequence of *Campylobacter fetus* Isolated from a Sheep. *Microbiology resource announcements*, 9(45), e01008-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.01008-20>
- Couderc, J.J. (2007). *ALIMENTACIÓN Y ACIDOSIS EN EL ENGORDE A CORRAL*. Sitio Argentino de Producción Animal. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_o_engorde_a_corral_o_feedlot/49-acidosis.pdf

- CYTED. (2014). *GUÍA PRÁCTICA DE PRODUCCIÓN OVINA EN PEQUEÑA ESCALA EN IBEROAMÉRICA* (p. 221).
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3919/1/Guia-Practica-para-produccion-ovina-en-Iberoamerica.pdf>
- Della Rosa, P. (2021). Diagnóstico de abortos y muertes perinatales en ovinos en diferentes regiones de Argentina y estudio de la seroprevalencia de *Chlamydia abortus* y *Leptospira* spp. en tambos ovinos de la provincia de Buenos Aires. Paola Della Rosa. Tesis de Maestría en Sanidad Animal, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, en prensa.
- De Long, E. (1992). Archaea in coastal marine environments. *89 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5685–5689.
- Delpiazzo, R., Barcellos, M., Barros, S., Betancor, L., Fraga, M., Gil, J., Iraola, G., Morsella, C., Paolicchi, F., Pérez, R., Riet-Correa, F., Sanguinetti, M., Silva, A., da Silva Silveira, C., & Calleros, L. (2021). Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. *Veterinary and Animal Science*, 11, 100163.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100163>
- Dohoo, I.R., Martin, S.W., & Stryhn, H. (2009). Veterinary epidemiologic research. VER, Inc.
- Dorsch, M.A., Casaux, M.L., Calleros, L., Aráoz, V., Caffarena, R.D., Monesiglio, C., Barcellos, M., da Silva Silveira, C., Perdomo, Y., Banchero, G., Uzal, F. A., Fraga, M., & Giannitti, F. (2021a). Placentitis and abortion caused by a multidrug resistant strain of *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* in a sheep in Uruguay. *Revista Argentina de microbiología*, S0325-7541(21)00038-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.005>
- Dorsch, M.A., Canton, G., Driemeier, M., Anderson, M., Moeller, R., & Giannitti, F. (2021b). Bacterial, protozoal and viral abortions in sheep and goats in South America: A review. *Small Ruminant Research*, (205).
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106547>
- Duncan, J., Leatherbarrow, A., French, N., & Grove-White, D. (2014). Temporal and farm-management-associated variation in faecal-pat prevalence of *Campylobacter fetus* in sheep and cattle. *Epidemiology and Infection*, 142(6), 1196–1204.
- Durso, L.M., Harhay, G.P., Bono, J.L., & Smith, T.P. (2011). Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analyzed using a metagenomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 278–282.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.008>
- Durso, L.M., Harhay, G.P., Smith, T.P.L., Bono, J.L., DeSantis, T.Z., Harhay, D.M., Andersen, G.L., Keen, J.E., Laegreid, W.W., & Clawson, M.L. (2010). Animal-to-Animal Variation in Fecal Microbial Diversity among Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4858 LP – 4862.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00207-10>
- Echeverry, A., Loneragan, G.H., Wagner, B.A. and B., & M.M. (2005). Effect of intensity of fecal pat sampling on estimates of *Escherichia coli* O157 prevalence. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 2023–2027.

- Glanville, E. (2017). *The Effect of Vaccination Against Campylobacter on Maiden Ewe Reproduction in Victoria* [University of Melbourne]. https://minerva-access.unimelb.edu.au/bitstream/handle/11343/210742/EJGlanville_MastersVetScience_Thesis_151217.pdf
- Faber, J., & Fonseca, L.M. (2014). How sample size influences research outcomes. *Dental press journal of orthodontics*, 19(4), 27–29. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo>
- Fanning, J.P. (2016). *Pathogenesis of subacute ruminal acidosis in sheep* [University of Adelaide]. <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/103692/2/02whole.pdf>
- Fernández Abella, D. (2011). Pérdidas embrionarias y fetales en ovinos en Uruguay. *XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 189–196. <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/757?show=full>
- Fiorentino, M.A., Hecker, Y., Morsella, C., Stazionati, M., Romero, H., & Bedotti, D. (2015). *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* asociado a un brote de abortos en ovinos. 9no Seminario de la “Fundación Charles Louis Davis”.
- Fitzgerald, C., Stanley, K., Andrew, S., & Jones, K. (2001). Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1429–1436.
- Flagstad, Ø., Røed, K., Stacy, J.E., & Jakobsen, K.S. (1999). Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology*, 8, 879–883.
- Fornefett, J., Busch, A., Döpping, S., Hotzel, H., & Rimek, D. (2021). Bacterial gastroenteritis caused by the putative zoonotic pathogen *Campylobacter lanienae*: First reported case in Germany. *Access microbiology*, 3(3), 000199. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000199>
- Ganzábal, A., Montossi, F., Ciappesoni, G., Ravagnolo, O., San Julián, R., & Luzardo, S. (2007). PRODUCCIÓN DE CARNE OVINA DE CALIDAD: Resultados: comportamiento reproductivo y habilidad materna de ovejas, crecimiento y calidad de canal de corderos. [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/18429240309122939.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos_compartidos/18429240309122939.pdf)
- Ganzábal, A. (2018). Perros de guarda para disminuir la incidencia de depredadores en rebaños latinoamericanos Experiencia en Uruguay. In INIA (Ed.), *GUÍA PRÁCTICA DE PRODUCCIÓN OVINA EN PEQUEÑA ESCALA EN IBEROAMÉRICA*. CYTED. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3919/1/Guia-Practica-para-produccion-ovina-en-Iberoamerica.pdf>
- Giannitti, F., Aráoz, V., Caffarena, R.D., Monesiglio, C., Calleros, L., Barcellos, M., Silveira, C., & Fraga, M. (2018). Placentitis caused by *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* in an aborted sheep in Colonia, Uruguay. *X Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinario*.

- Glen, S. (2021). *Regression Analysis: Step by Step Articles, Videos, Simple Definitions*. StatisticsHowTo.Com: Elementary Statistics for the Rest of Us! <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/regression-analysis/>
- Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schoberr, C., Dieber, F., Köfer, J., Zechner, R., & Zechner, E.L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2537–2546.
- Grattarola, M. (2013). De la ecografía al destete: cómo obtener más corderos. *Lana Noticias*, 165, 14–17.
- Grau, F.H. (1988). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis* in the intestinal tract and on the carcasses of calves and cattle. *Journal of Food Protection*, 51(11), 857–861. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-51.11.857>
- Griffiths, P.L., & Park, R.W. (1990). *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *The Journal of Applied Bacteriology*, 69(3), 281–301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01519.x>
- Grove-White, D., Leatherbarrow, A., Cripps, P., Diggle, P., & French, N. (2010). Temporal and farm-management-associated variation in the faecal-pat prevalence of *Campylobacter jejuni* in ruminants. *Epidemiology and Infection*, 138(4), 549–558. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991051>
- Guerin, M.T., Martin, W., Reiersen, J., Berke, O., McEwen, S.A., Bisaillon, J.R., & Lowman, R. (2007). A farm-level study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. *Acta veterinaria Scandinavica*, 49(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-18>
- Guo, Y., Logan, H. L., Glueck, D. H., & Muller, K. E. (2013). Selecting a sample size for studies with repeated measures. *BMC Medical Research Methodology*, 13(1), 100–100. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-13-100>
- Haine, D., Dohoo, I., & Dufour, S. (2018). Selection and misclassification biases in longitudinal studies. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00099>
- Hannon, S.J., Allan, B., Waldner, C., Russell, M.L., Potter, A., Babiuk, L.A., & Townsend, H.G.G. (2009). Prevalence and risk factor investigation of *Campylobacter* species in beef cattle feces from seven large commercial feedlots in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 73(4), 275–282. <http://europepmc.org/abstract/MED/20046629>
- Hansson, I., Olsson Engvall, E., Ferrari, S., Harbom, B., & Lahti, E. (2020). Detection of *Campylobacter* species in different types of samples from dairy farms. *The Veterinary Record*, 186(18), 605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1136/vr.105610>
- Harrell, F.E. (2020). *Hmisc: Harrell Miscellaneous* (R package version 4.3-1). <https://cran.r-project.org/package=Hmisc>
- Hedstrom, O.R., Sonn, R.J., Lassen, E.D., Hultgren, B.D., Crisman, R.O., Smith, B.B., & Snyder, S.P. (1987). Pathology of *Campylobacter jejuni* Abortion in Sheep. *Veterinary Pathology*, 24(5), 419–426. <https://doi.org/10.1177/030098588702400509>

- Hernández, J., Benedito, J.L., Abuelo, A., & Castillo, C. (2014). Ruminal Acidosis in Feedlot: From Aetiology to Prevention. *The Scientific World Journal*, 2014, 702572. <https://doi.org/10.1155/2014/702572>
- Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R.O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., Clark, C., Perbost, C., Jarvie, T., Du, L., & Galán, J.E. (2006). Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infection and Immunity*, 74(8), 4694–4707. <https://doi.org/10.1128/IAI.00210-06>
- Hum, S., Hornitzky, M., & Berg, T. (2009). Ovine Campylobacteriosis. *Agricultural Institute*.
<http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ahl/ANZSDP-Ovine-campylobacteriosis.pdf>
- Inglis, G.D., Kalischuk, L.D., Busz, H.W., & Kastelic, J.P. (2005). Colonization of cattle intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5145–5153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5145-5153.2005>
- Inglis, G.D., Kalischuk, L.D., & Busz, H.W. (2004). Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 410–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02313.x>
- Inglis, G.D., & Kalischuk, L.D. (2003). Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3435–3447. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3435-3447.2003>
- INIA. (2005). *Reproducción ovina: recientes avances realizados por el INIA. Seminario de Actualización técnica*. (INIA (ed.)).
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4581/1/SAD-401.pdf>
- Iraola, G., Betancor, L., Calleros, L., Gadea, P., Algorta, G., Galeano, S., Muxi, P., Greif, G., & Pérez, R. (2015). A rural worker infected with a bovine-prevalent genotype of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* supports zoonotic transmission and inconsistency of MLST and whole-genome typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(8), 1593–1596. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2393-y>
- Iraola, G., Pérez, R., Betancor, L., Marandino, A., Morsella, C., Méndez, A., Paolicchi, F., Piccirillo, A., Tomás, G., Velilla, A., & Calleros, L. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 286. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>
- Jay-Russell, M.T., Bates, A., Harden, L., Miller, W.G., & Mandrell, R.E. (2012). Isolation of *Campylobacter* from feral swine (*Sus scrofa*) on the ranch associated with the 2006 *Escherichia coli* O157:H7 spinach outbreak investigation in California. *Zoonoses and Public Health*, 59(5), 314–319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01465.x>
- Jones, K., Howard, S., & Wallace, J.S. (1999). Intermittent shedding of thermophilic *Campylobacters* by sheep at pasture. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 531–536.

- Kenyon, P.R., Maloney, S., & Blache, D. (2014). Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57(1), 38-64. <https://doi.org/10.1080/00288233.2013.857698>
- Kim, M., Kim, J., Kuehn, L. A., Bono, J.L., Berry, E.D., Kalchayanand, N., Freetly, H. C., Benson, A.K., & Wells, J.E. (2014). Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *Journal of Animal Science*, 92(2), 683–694. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas.2013-6841>
- Kimman, T., Hoek, M., & de Jong, M.C.M. (2013). Assessing and controlling health risks from animal husbandry. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 66, 7–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.njas.2013.05.003>
- Kittelmann, S., Kirk, M.R., Jonker, A., McCulloch, A., & Janssen, P.H. (2015). Buccal Swabbing as a Noninvasive Method To Determine Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Microbial Community Structures in the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7470–7483. <https://doi.org/10.1128/AEM.02385-15>
- Kotecha, D. (2015). *The difference between 'Effect Modification' & 'Confounding.'* <https://s4be.cochrane.org/blog/2015/06/04/difference-effect-modification-confounding/>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108–108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kudva, I.T., Hunt, C.W., Williams, C.J., Nance, U.M., & Hovde, C.J. (1997). Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Washington, DC: American Society for Microbiology*, 63(10), 3878–3886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.3878-3886.1997>
- Lahodny, G.E., Jr, Gautam, R., & Ivanek, R. (2017). Understanding the effects of intermittent shedding on the transmission of infectious diseases: example of salmonellosis in pigs. *Journal of biological dynamics*, 11(1), 436–460.
- Lakens, D. (2016). *One-sided tests: Efficient and Underused.* <http://daniellakens.blogspot.com/2016/03/one-sided-tests-efficient-and-underused.html>
- Leblanc-Maridor, M., Beaudeau, F., Seegers, H., Denis, M., & Belloc, C. (2011). Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. *BMC Microbiology*, 11(1), 113–113. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-113>
- Lévesque, S., Lemay, F., Bekal, S., Frost, E.H., & Michaud, S. (2016). First reported case of *Campylobacter lanienae* enteritis in a human. *JMM Case Reports*, 3(3), e005045–e005045. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005045>
- Linton, D., Owen, R.J., & Stanley, J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology*, 147(9), 707–718. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)85118-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)85118-2)

- Liu, K.C., Jinneman, K.C., Neal-McKinney, J., Wu, W.H., & Rice, D.H. (2017). Simultaneous Identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* with SmartCycler-Based Multiplex Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(7), 371–378. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2245>
- Logan, J.M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A.J., & Stanley, J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 865–872. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-865>
- Lorimor, J., Powers, W., & Sutton, A. (2004). *Manure Characteristics* (Second Edi, pp. 1–24). https://www.canr.msu.edu/uploads/files/ManureCharacteristicsMWPS-18_1.pdf
- LPSN. (2021). *Genus Campylobacter*. <https://lpsn.dsmz.de/genus/campylobacter>
- Lv, R., Wang, K., Feng, J., Heeney, D.D., Liu, D., & Lu, X. (2020). Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2920. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02920>
- Magajna, B., & Schraft, H. (2015). *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. *Food Control*, 50, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.022>
- Mannering, S.A., West, D.M., Fenwick, S.G., Marchant, R.M., & O’Connell, K. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* sheep abortion isolates. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 237–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.005>
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W. (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports*, 5(1), 16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>
- Mawdsley, J.L., Bardgett, R.D., Merry, R.J., Pain, B.F., & Theodorou, M.K. (1995). Review: pathogens in livestock waste, their potential movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology*, 2, 1–15.
- Meuli, L., & Dick, F. (2018). Understanding Confounding in Observational Studies. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 55(5), 737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2018.02.028>
- Morgavi, D.P., Rathahao-Paris, E., Popova, M., Bocard, J., Nielsen, K.F., & Boudra, H. (2015). Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01060>

- Mota, M.I., Gadea, M.P., González, S., Pardo, L., Sirok, A., Rivas, M., Algorta, G., Schelotto, F., & Varela, G. (2010). Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 114–117. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213014892009>
- Mou, K.T., Muppirala, U.K., Severin, A.J., Clark, T.A., Boitano, M., & Plummer, P.J. (2015). A comparative analysis of methylome profiles of *Campylobacter jejuni* sheep abortion isolate and gastroenteric strains using PacBio data. *Frontiers in Microbiology*, 5, 782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00782>
- Mughini Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J.A., de Boer, A.G., Havelaar, A.H., Friesema, I.H., French, N.P., Busani, L., & van Pelt, W. (2012). Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PloS one*, 7(8), e42599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042599>
- Muñoz-Vargas L, Opiyo SO, Digianantonio R, Williams ML, Wijeratne A, et al. (2018) Fecal microbiome of periparturient dairy cattle and associations with the onset of *Salmonella* shedding. *PLOS ONE* 13(5): e0196171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196171>
- Navarro-González, N., Ugarte-Ruiz, M., Porrero, M.C., Zamora, L., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Lavín, S., & Domínguez, L. (2014). *Campylobacter* shared between free-ranging cattle and sympatric wild ungulates in a natural environment (NE Spain). *EcoHealth*, 11(3), 333–342. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0921-3>
- Naylor, S.W., Low, J.C., Besser, T.E., Mahajan, A., Gunn, G.J., Pearce, M.C., McKendrick, I.J., & Smith, D.G. (2003). Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity*, 71, 1505–1512.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., & On, S.L. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3800–3810. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3800-3810.2000>
- Notejane, M., Pandolfo, S., García, L., Parada, M., Coedo, V., Betancor, L., Gadea, P., Algorta, G., & Pérez, W. (2015). Gastroenteritis aguda: formas de presentación clínica y etiología en niños hospitalizados en el Hospital Pediátrico, Centro Hospitalario Pereira Rossell, año 2012. *Archivos de Pediatría Del Uruguay*, 86, 91–97.
- Ogden, I.D, Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J.C., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M., & Pennington, T.H. (2002). Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters of Applied Microbiology*, 34(2), 100–104. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01052.x>

- Ogden, I.D., Dallas, J.F., Macrae, M., Rotariu, O., Reay, K.W., Leitch, M., Thomson, A.P., Sheppard, S.K., Maiden, M., & Forbes, K.J. (2009). *Campylobacter* Excreted into the Environment by Animal Sources : Prevalence , Concentration Shed , and Host Association. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1161–1170. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0327.Campylobacter>
- OIE. (2018). Capítulo 3.9.3. Infección por *Campylobacter jejuni* y *C. coli*. *Manual Terrestre de la OIE*.
- On, S.L. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 9, 405–422.
- Oporto, B., & Hurtado, A. (2011). Emerging thermotolerant *Campylobacter* species in healthy ruminants and swine. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(7), 807–813. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0803>
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J., & Schreiber, S. (2004). Quantification of Intestinal Bacterial Populations by Real-Time PCR with a Universal Primer Set and Minor Groove Binder Probes: a Global Approach to the Enteric Flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2566–2572. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004>
- Owen, R.J., Sutherland, K., Fitzgerald, C., Gibson, J., Borman, P., & Stanley, J. (1995). Molecular subtyping scheme for serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), 872–877. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.4.872-877.1995>
- Patino, C.M., & Ferreira, J.C. (2016). What is the importance of calculating sample size? *Jornal Brasileiro de Pneumologia : Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 42(2), 162. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000114>
- Pearce, M.C., Fenlon, D., Low, J.C., Smith, A.W., Knight, H.I., Evans, J., Foster, G., Syngé, B.A., & Gunn, G. J. (2004). Distribution of *Escherichia coli* O157 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 5737–5743.
- Pedersen, T.L. (2019). *Patchwork: The Composer of Plots* (R package version 1.0.0).
- Pires, A., Patterson, L., Kukiélka, E.A., Aminabadi, P., Navarro-Gonzalez, N., & Jay-Russell, M.T. (2019). Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in livestock raised on diversified small-scale farms in California. *Epidemiology and infection*, 147, e321. <https://doi.org/10.1017/S095026881900205X>
- Rapp, D. (2010). DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1485–1493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04606.x>
- Rizzo, H., Gregory, L., Beraldi, F., Feola de Carvalho, A., & Pinheiro, E. (2015). *Campylobacter* isolation from the feces of sheep with a history of reproductive disorders bred in the state of São Paulo, Brazil. *SEMINA: CIENCIAS AGRARIAS*, 36. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4207>

- Robinson, S.E., Brown, P.E., Wright, E.J., Bennett, M., Hart, C.A., & French, N.P. (2005). Heterogeneous distributions of *Escherichia coli* O157 within naturally infected bovine faecal pats. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 291–296.
- Ravel, A., Pintar, K., Nesbitt, A., & Pollari, F. (2016). Non food-related risk factors of campylobacteriosis in Canada: a matched case-control study. *BMC public health*, 16(1), 1016. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3679-4>
- Rudi, K., Høidal, H. K., Katla, T., Johansen, B. K., Nordal, J., & Jakobsen, K.S. (2004). Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 790–797. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.790-797.2004>
- Rukambile, E., Sintchenko, V., Muscatello, G., Kock, R., & Alders, R. (2019). Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. *Zoonoses and Public Health*, 66(6), 562–578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/zph.12611>
- Rushton, S.P., Humphrey, T.J., Shirley, M.D., Bull, S., & Jørgensen, F. (2009). *Campylobacter* in housed broiler chickens: a longitudinal study of risk factors. *Epidemiology and infection*, 137(8), 1099–1110. <https://doi.org/10.1017/S095026880800188X>
- Sahin, O., Plummer, P.J., Jordan, D.M., Sulaj, K., Pereira, S., Robbe-Austerman, S., Wang, L., Yaeger, M.J., Hoffman, L.J., & Zhang, Q. (2008). Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1663–1671. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.00031-08>
- Sahin, O., Yaeger, M., Wu, Z., & Zhang, Q. (2017). *Campylobacter*-Associated Diseases in Animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1), 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022826>
- Sanad, Y.M., Jung, K., Kashoma, I., Zhang, X., Kassem, I.I., Saif, Y.M., & Rajashekara, G. (2014). Insights into potential pathogenesis mechanisms associated with *Campylobacter jejuni*-induced abortion in ewes. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 274. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0274-8>
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C., Mora, A., Rey, J., & Alonso, J.M. (2009). Longitudinal Study of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding in Sheep Feces: Persistence of Specific Clones in Sheep Flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1769 LP – 1773. <https://doi.org/10.1128/AEM.02043-08>
- Sasaki, Y., Goshima, T., Mori, T., Murakami, M., Haruna, M., Ito, K., & Yamada, Y. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11), 985–991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1548>

- Sasaki, Y., Fujisawa, T., Ogikubo, K., Ohzono, T., Ishihara, K., & Takahashi, T. (2003). Characterization of *Campylobacter lanienae* from pig feces. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(1), 129–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1292/jvms.65.129>
- Schunck, B., Kraft, W., & Truyen, U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods*, 55(3), 427–433. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)00069-3](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)00069-3)
- Schweitzer, N., Damjanova, I., Kaszanyitzky, E., Ursu, K., Samu, P., Tóth, A.G., Varga, J., & Dán, A. (2011). Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* strains isolated from food-producing animals. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 615–621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0754>
- Sébald, M & Véron, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Ann Inst Pasteur*, 105, 897-910
- Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL). (2018). *Manual Práctico de Producción Ovina*. https://www.sul.org.uy/descargas/lib/Manual_Práctico_de_Producción_Ovina-2018.pdf
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R.J., McLellan, S. L., Huse, S.M., & Sogin, M.L. (2011). Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2992–3001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02988-10>
- Sharma, V.K., & Dean-Nystrom, E.A. (2003). Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Veterinary Microbiology*, 93, 247–260.
- Shin, E., Lee, Y. (2009). Comparison of three different methods for *Campylobacter* isolation from porcine intestines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(7), 647–650.
- Skirrow, M.B. (2006). John McFadyean and the Centenary of the First Isolation of *Campylobacter* Species. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1213–1217. <https://doi.org/10.1086/508201>
- Sproston, E.L., Ogden, I.D., MacRae, M., Dallas, J.F., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Colles, F.M., Wilson, M.J., Forbes, K.J., & Strachan, N.J.C. (2011). Temporal variation and host association in the *Campylobacter* population in a longitudinal ruminant farm study. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6579–6586. <https://doi.org/10.1128/AEM.00428-11>
- Stahl, M., & Vallance, B.A. (2015). Insights into *Campylobacter jejuni* colonization of the mammalian intestinal tract using a novel mouse model of infection. *Gut Microbes*, 6(2), 143–148. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1016691>
- Stanley, K., & Jones, K. (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(s1), 104–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.12.x>

- Stanley, K.N., Wallace, J.S., Currie, J.E., Diggle, P.J., & Jones, K. (1998). The seasonal variation of thermophilic *Campylobacters* in beef cattle, dairy cattle and calves. *Journal of Applied Microbiology*, 85(3), 472–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.853511.x>
- Stewart, D.S., Tortorello, M.L., & Gendel, S.M. (1998). Evaluation of DNA preparation techniques for detection of the SLT-1 gene of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces using the polymerase chain reaction. *Letters of Applied Microbiology*, 26, 93–97.
- Szumilas, M. (2010). Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie Canadienne de Psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent*, 19(3), 227–229. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20842279>
- Tanca, A., Fraumene, C., Manghina, V., Palomba, A., Abbondio, M., Deligios, M., Pagnozzi, D., Addis, M.F., & Uzzau, S. (2017). Diversity and functions of the sheep faecal microbiota: a multi-omic characterization. *Microbial Biotechnology*, 10(3), 541–554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.12462>
- Tapia, J.N.F. (1994). Razón de posibilidades: una propuesta de traducción de la expresión odds ratio [Razón de posibilidades: a proposed translation of the term odds ratio]. *Salud Pública de México*, 36(1), 124–125.
- Trochimchuk, T., Fotheringham, J., Topp, E., Schraft, H., & Leung, K.T. (2003). A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157: H7 in cattle manure. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 165–175.
- Vandamme, P., & Ley, J. (1991). Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-451>
- Vander Weele, T.J. (2012). Confounding and effect modification: distribution and measure. *Epidemiologic Methods*, 1(1), 55–82. <https://doi.org/10.1515/2161-962X.1004>
- Vondrakova, L., Pazlarova, J., & Demnerova, K. (2014). Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathogens*, 6(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-12>
- Wayne, W.L., & Sullivan, L. (2021). *Confounding and Effect Measure Modification*. https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704-ep713_confounding-em/bs704-ep713_confounding-em_print.html
- Wickham. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag.
- Wickham, H. (2020a). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* (R package version 0.8.4). <https://cran.r-project.org/package=dplyr>
- Wickham, H. (2020b). *tidyr: Tidy Messy Data* (R package version 1.0.2). <https://cran.r-project.org/package=tidyr>

- Wu, Z., Sippy, R., Sahin, O., Plummer, P., Vidal, A., Newell, D., & Zhang, Q. (2014). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates associated with sheep abortion in the United States and Great Britain. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 1853–1861. <https://doi.org/10.1128/JCM.00355-14>
- Yang, R., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A.J., & Ryan, U. (2014). Longitudinal prevalence, faecal shedding and molecular characterisation of *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in sheep. *Veterinary Journal*, 202(2), 250–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.001>

ANEXOS

ANEXO A. Métodos de extracción

A. Protocolo de extracción de ADN por *Fast Boiling Preparation* sin agitación

- Transferir 200 μ L del suero fisiológico que contiene las muestras a un tubo de microcentrífuga
- Hervir durante 10 minutos a 101°C en baño seco
- Enfriar en hielo por 5 minutos
- Centrifugar a 3000 g a 4°C durante 20 minutos
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y almacenarlo a -20°C

B. Protocolo de extracción de ADN por *Fast Boiling Preparation* con agitación

- Agitar la muestra con vórtex por 5 segundos
- Transferir 200 μ L del suero que contiene las muestras a un tubo de microcentrífuga
- Hervir durante 10 minutos a 101°C en baño seco
- Enfriar en hielo por 5 minutos
- Centrifugar a 3000 g a 4°C durante 20 minutos
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y almacenar a -20°C

ANEXO B. Cebadores y condiciones de reacción de PCR para la identificación del gen 16S de bacterias y archaeas en general

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Referencias
Bac27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Barcellos, 2018; Ott et al., 2004
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Barcellos 2018; Lane et al., 1985

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen µL/tubo
Agua ultrapura	--	c,s,p 10
PCR buffer	1X	1
MgCl ₂	2,5 mM	1
BSA	0,4 mg/mL	0,5
dNTP'S	0,25 mM	0,25
Taq polimerasa	0,75 U	0,15
Primer BAC27F	0,5 µM	0,5
Primer 534R	0,5 µM	0,5
ADN	--	1

Condiciones de ciclado para la amplificación del gen *16S* de bacterias y archaeas en general

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	3:00	
Desnaturalización	94	0:30	30 ciclos
Hibridación	54	0:30	
Extensión	72	1:30	
Extensión final	72	7:00	

ANEXO C. Protocolo de extracción de ADN con kit ZYMO Miniprep fecal/soil

- Agregar 150 mg de una solución de materia fecal (1 g de materia fecal en 10 mL de PBS 1X) en el *ZR Bashing bead lysis tube* y agregar 750 µL de *Bashing bead buffer* al tubo
- Colocar los tubos sobre una platina de agitación a velocidad media por 20 minutos
- Centrifugar el *Bashing bead lysis tube* a 10,000 g por 1 minuto (12 210 rpm)
- Transferir 400 µL a la columna de *ZYMO spin III F Filter* dentro de un tubo de colecta y centrifugar a 8000 g por un minuto
- Agregar 1200 µL de *Genomic Lysis buffer* a lo que quedó en el tubo de colecta anterior
- Transferir 800 µL de la solución resultante anterior a la columna *Zymo Spin IIC* con tubo de colección nuevo y centrifugar a 10000 g por un minuto
- Descartar el filtrado del paso anterior del tubo de colección y repetir el paso anterior, (pipetear 800 y centrifugar)
- Agregar 200 µL de *DNA pre wash buffer* al *ZYMO Spin IIC* en un tubo de colecta nuevo y centrifugar a 10 000 g por 1 minuto
- Transferir la columna *ZYMO Spin IIC* a un tubo de 1,5 mL nuevo y agregarle 70 µL de *DNA Elution buffer*, Centrifugar 30 segundos a 10000 g
- Colocar el *ZYMO Spin III HRC Filter* en un tubo de colecta nuevo y agregar 600 µL de *Prep solution* y centrifugar a 8000 g por 3 minutos
- Transferir el ADN eluido a *ZYMO Spin III HRC Filter* (anterior preparado) en un tubo de 1,5 mL nuevo
- Centrifugar a 16000 g por 3 minutos
- Conservar el ADN filtrado a -20°C.

ANEXO D. Cebadores y condiciones de reacción de qPCR para la identificación del gen *hipOa* de *Campylobacter jejuni*

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Referencia
hipOf	TGCACCAGTGACTATGAATAACGA	Vondrakova et al., 2014
hipOR	TCCAAAATCCTCACTTGCCATT	Vondrakova et al., 2014
hipOsonda	JOE- TTGCAACCTCACTAGCAAAATCCACAGCT- Eclipse	Vondrakova et al., 2014

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen μL /tubo
Agua ultrapura	--	c.s.p. 25 μL
Master Mix (Bioron)	1X	12,5
MgCl ₂	2 mM	2
BSA	0,4 mg/mL	1
hipOcf	0,3 μM	1
hipOR	0,3 μM	1
hipOsonda	0,1 μM	0,5
ADN	--	2

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
-------	------------------------------------	--------------

Desnaturalización inicial	95	10:00
Desnaturalización	95	0:15
Hibridación + extensión	60	1:00
Extensión final	60	1:00

40 ciclos

ANEXO E. Cebadores y condiciones de reacción de PCR para la identificación del gen 16S de de *Campylobacter*

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Referencia
C412F	GGATGACACTTTCGGAGC	Linton et al., 1996
C1228R	CATTGTAGCACGTGTGTGTC	Linton et al., 1996

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen µL/tubo
Agua ultrapura	--	c.s.p. 10
PCR buffer	1X	1
MgCl ₂	2,5 mM	1
BSA	0,4 mg/mL	0,5
dNTP'S	0,25 mM	0,25
Taq polimerasa	0,75 U	0,15
Primer C412F	0,5 µM	0,5
Primer C1228R	0,5 µM	0,5
ADN	--	1

Etapas **Temperatura (°C)** **Tiempo (min)**

Desnaturalización inicial	95	2:00	15 ciclos
Desnaturalización	95	0:20	
Hibridación	53	0:20	
Extensión	72	1:00	
Desnaturalización	95	0:20	15 ciclos
Hibridación	52	0:20	
Extensión	72	1:00	
Desnaturalización	95	0:20	15 ciclos
Hibridación	51	0:20	
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	

ANEXO F. Protocolos de purificación de ADN

A) Protocolo de purificación de productos de PCR (*ZYMO DNA Clean & Concentrator*)

- Adicionar 5 volúmenes de buffer de unión por cada volumen de muestra de ADN
- Transferir la mezcla a una columna *Zymo-Spin* en un tubo colector
- Centrifugar por 30 segundos a una velocidad ≥ 10000 g, y descartar el filtrado
- Agregar 200 μ L de buffer de lavado y centrifugar por 30 segundos a ≥ 10000 g
- Repetir el paso de lavado
- Pasar la columna a un tubo nuevo de 1,5 mL
- Agregar 15 μ L de buffer de elución directamente a la columna e incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar 30 segundos

B) Purificación de producto de PCR con pelotitas magnéticas (*AMPure XP*)

- Agitar vigorosamente las pelotitas magnéticas hasta asegurarse de formar una solución homogénea.
- Agregar la solución de pelotitas magnéticas a la muestra según la siguiente relación: 1 volumen de producto de PCR 1,8 volúmenes de pelotitas magnéticas.
- Mezclar bien por pipeteo y dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar el tubo con la tapa abierta en la placa magnética asegurándose que la pared del tubo esté en contacto con el imán. Esperar a que la solución se clarifique, observándose un pellet de pelotitas magnéticas (1-2 minutos).
- Con el tubo ubicado en la placa magnética, retirar con pipeta todo el sobrenadante con mucho cuidado de no distorsionar el pellet de pelotitas magnéticas.
- Con el tubo ubicado en la placa magnética, agregar 200 μ L de etanol 70% y dejar por reposar 30 segundos a temperatura ambiente.
- Con el tubo ubicado en la placa magnética, retirar con pipeta el etanol 70% y repetir este paso retirando el etanol luego del segundo lavado.

- Con el tubo ubicado en la placa magnética, dejar secar el pellet de pelotitas magnéticas.
- Retirar el tubo de la placa magnética y agregar el volumen deseado de buffer TE (20-40 μ L) mezclando por pipeteo hasta disolución del pellet.
- Colocar el tubo nuevamente en la placa magnética y esperar a que la solución clarifique.
- Pasar a un nuevo tubo el sobrenadante, teniendo cuidado de no remover el pellet de pelotitas magnéticas. El sobrenadante contiene el ADN purificado.
- Guardar el ADN purificado y descartar el tubo con las pelotitas magnéticas.

ANEXO G. Cuantificación de ácidos nucleicos de contaminaciones fecales con la cepa M3 de *C. jejuni* por dos métodos de extracción.

Extracción	<i>Fast Boiling Preparation</i>	Concentración ADN ng/μL	260/280	260/230
Dilución				
	-1	298.1	1.24	0.63
	-2	178.4	1.21	0.48
	-3	116.4	1.23	0.50
	-4	138.0	1.22	0.48
	-5	155.2	1.24	0.49
	-6	171.0	1.25	0.50
	Oveja 7120	142.2	1.34	0.49

Extracción	<i>Kit ZYMO Miniprep fecal/soil</i>	Concentración ADN ng/μL	260/280	260/230
Dilución				
	-1	13.9	1.88	0.76
	-2	6.8	1.99	0.37
	-3	8.5	2.35	0.44
	-4	4.7	1.94	0.33
	-5	7.7	1.85	0.37
	-6	12.7	2.15	0.27

ANEXO H. Categoría y datos reproductivos de los predios 2a y 2b

Predio 2a.

Caravana	categoría	Ecografía	Fecha de parto
272	Oveja	2	26/8/2020
279	Oveja	1	4/9/2020
401	Borrega	1	1/9/2020
411	Borrega	1	15/9/2020
412	Borrega	1	25/8/2020
416	Borrega	1	20/9/2020
3247	Oveja	1	25/9/2020
3535	Oveja	2	2/9/2020
3575	Oveja	S/D	20/9/2020
3603	Oveja	S/D	24/9/2020
3659	Oveja	S/D	S/D
3672	Oveja	S/D	22/9/2020
3697	Oveja	2	20/9/2020
3710	Oveja	2	1/8/2020
3711	Oveja	1	3/9/2020
3721	Oveja	1	24/9/2020
3723	Oveja	1	6/9/2020
3740	Oveja	S/D	S/D
3747	Oveja	1	26/8/2020
3750	Oveja	1	28/8/2020
3754	Oveja	1	10/9/2020
3758	Oveja	2	3/9/2020
3790	Oveja	S/D	4/9/2020
3800	Borrega	S/D	30/8/2020
3803	Borrega	1	2/9/2020
3819	Borrega	1	3/9/2020
3820	Borrega	1	7/9/2020
3828	Borrega	S/D	22/9/2020
3833	Borrega	1	3/9/2020
3836	Borrega	1	5/9/2020
3837	Borrega	1	S/D
3847	Borrega	1	2/9/2020
3848	Borrega	1	2/9/2020
3849	Borrega	S/D	S/D
3853	Borrega	S/D	6/9/2020
3854	Borrega	1	S/D
3855	Borrega	2	26/8/2020
3883	Borrega	1	1/9/2020
3896	Borrega	S/D	2/9/2020

S/D sin determinar

Predio 2b.

Caravana	Categoría	Servicio 1	Servicio 2	Ecografía día 30	Ecografía día 60	Observaciones
91 A	Oveja	18/3/2020	S/D	1	1	
204 A	Oveja	4/3/2020	23/3/2020	2	2	
212 A	Oveja	14/3/2020	S/D	2	2	
310 A	Oveja	18/3/2020	S/D	3	3	
334 A	Oveja	14/3/2020	S/D	2	2	
352 A	Oveja	12/3/2020	30/3/2020	S/D	2	1 muerto
353 A	Oveja	S/D	S/D	4	4	
366 A	Oveja	9/3/2020	S/D	2	2	
387 A	Oveja	17/3/2020	S/D	S/D	1	
419 A	Oveja	11/3/2020	S/D	2	2	
6008 V	Borrega	4/3/2020	18/3/2020	1	1	
6046 V	Borrega	10/3/2020	S/D	S/D	0	
6076 V	Borrega	7/3/2020	30/3/2020	1	1	
6118 V	Borrega	23/3/2020	S/D	2	2	
6157 V	Borrega	10/3/2020	25/3/2020	S/D	0	
6164 V	Borrega	23/3/2020	3/4/2020	2	2	
6200 V	Borrega	18/3/2020	S/D	1	1	
6203 V	Borrega	10/3/2020	S/D	2	2	
6218 V	Borrega	23/3/2020	S/D	S/D	1	
6272 V	Borrega	23/3/2020	3/4/2020	1	1	
6273 V	Borrega	15/3/2020	S/D	S/D	1	
6281 V	Borrega	5/3/2020	3/4/2020	S/D	1	
6338 V	Borrega	30/3/2020	S/D	1	1	
6413 V	Borrega	4/3/2020	S/D	2	2	
6417 V	Borrega	12/3/2020	S/D	1	1	
6445 V	Borrega	16/3/2020	14/4/2020	S/D	1	
6450 V	Borrega	S/D	S/D	S/D	0	
6461 V	Borrega	23/3/2020	14/4/2020	1	1	
6577 A	Oveja	23/3/2020	S/D	1	1	
6580 A	Oveja	17/3/2020	S/D	3	3	
6628 A	Oveja	7/3/2020	S/D	2	2	
6632 A	Oveja	14/3/2020	S/D	3	3	
6640 A	Oveja	6/3/2020	S/D	3	1	
6653 A	Oveja	5/3/2020	18/3/2020	3	3	
6655 A	Oveja	15/3/2020	S/D	3	2	
6701 A	Oveja	18/3/2020	S/D	3	2	
6716 A	Oveja	7/3/2020	S/D	1	1	
6725 A	Oveja	11/3/2020	S/D	S/D	2	
6796 A	Oveja	25/3/2020	14/4/2020	S/D	2	

S/D: sin determinar

ANEXO I. Proporciones de animales excretando *Campylobacter* por predio y por categoría en los distintos tiempos

Predio 2a

T ₀	Muestras positivas	N	Proporción	Error Estándar	Intervalo de Confianza 95 %	Comparación proporciones * ²
Proporción total	4	35	0,11	0,05	0,03-0,27	--
Borregas	4	20	0,20	0,89	0,06-0,44	p > 0,05
Ovejas	0	15	0	0	0,00-0,22*	
T ₁						
Proporción total	1	36	0,03	0,03	<0,001-0,15	--
Borregas	1	19	0,05	0,51	0,01-0,26	p > 0,05
Ovejas	0	17	0	0	0,00-0,20*	
T ₂						
Proporción total	6	34	0,18	0,07	0,07-0,35	--
Borregas	4	17	0,24	0,10	0,07-0,50	p > 0,05
Ovejas	2	17	0,12	0,08	0,02-0,36	
T ₃						
Proporción total	26	34	0,76	0,07	0,59-0,89	--
Borregas	14	18	0,78	0,10	0,52-0,94	p > 0,05
Ovejas	12	16	0,75	0,11	0,48-0,93	
T ₄						
Proporción total	12	31	0,39	0,09	0,22-0,58	--
Borregas	8	19	0,42	0,11	0,20-0,67	p > 0,05
Ovejas	4	12	0,33	0,14	0,10-0,65	

*IC unilateral 97,5 %

*² H₀: $\pi_1 = \pi_1$, H_A: $\pi_1 \neq \pi_1$ (π proporción)

Predio 2b

T ₀	Muestras positivas	N	Proporción	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%	Comparación proporciones *2
Proporción total	8	35	0,23	0,07	0,11-0,40	--
Borregas	4	15	0,27	0,11	0,08-0,55	p > 0,05
Ovejas	4	19	0,21	0,09	0,06-0,46	
T ₁						
Proporción total	4	36	0,11	0,05	0,03-0,26	--
Borregas	4	18	0,22	0,10	0,06-0,48	p < 0,05
Ovejas	0	18	0,00	0,00	0,00-0,19*	
T ₂						
Proporción total	16	35	0,46	0,08	0,29-0,63	--
Borregas	12	19	0,63	0,11	0,38-0,84	p < 0,05
Ovejas	4	16	0,25	0,11	0,08-0,52	
T ₃						
Proporción total	14	26	0,54	0,10	0,33-0,73	--
Borregas	5	13	0,38	0,13	0,14-0,68	p > 0,05
Ovejas	9	13	0,69	0,13	0,39-0,91	
T ₄						
Proporción total	23	35	0,66	0,08	0,48-0,81	--
Borregas	7	15	0,47	0,13	0,21-0,73	p < 0,05
Ovejas	16	20	0,80	0,09	0,56-0,94	

*IC unilateral 97,5 %

*2 H₀: $\pi_1 = \pi_1$, H_A: $\pi_1 \neq \pi_1$, $\alpha = 0,05$

Proporciones de excreción de *Campylobacter* a lo largo del ensayo por borregas

Predio	Proporción	Error estándar	Intervalo de confianza 95%
T₀			
2a	0,20	0,89	0,06-0,44
2b	0,27	0,11	0,08-0,55
T₁			
2a	0,05	0,05	0,001-0,26
2b	0,22	0,10	0,06-0,48
T₂			
2a	0,24	0,10	0,07-0,50
2b	0,63	0,11	0,38-0,84
T₃			
2a	0,78	0,10	0,52-0,94
2b	0,38	0,13	0,14-0,68
T₄			
2a	0,42	0,11	0,20-0,67
2b	0,47	0,09	0,56-0,94

Proporciones de excreción de *Campylobacter* a lo largo del ensayo por ovejas

Predio	Proporción	Error estándar	Intervalo de confianza 95%
T₀			
2a	0,00	0,00	0,00-0,22*
2b	0,21	0,09	0,06-0,46
T₁			
2a	0,00	0,00	0,00-0,20*
2b	0,00	0,00	0,00-0,19*
T₂			
2a	0,12	0,08	0,01-0,36
2b	0,25	0,11	0,07-0,52
T₃			
2a	0,75	0,11	0,48-0,93
2b	0,69	0,13	0,39-0,91
T₄			
2a	0,33	0,14	0,10-0,65
2b	0,80	0,09	0,56-0,94

*IC unilateral 97,5 %

ANEXO J. Detalles modelos de regresión contruidos a partir de modelos saturados

T₀

Tabla J1. Evaluación de efecto de confusión en T₀

	Categoría	% variación con respecto al crudo*
Modelo 1 saturado	0,22	47%
Modelo 2	0,25	40%
Modelo 3	0,37	12%
Modelo 4 crudo	0,42	-

% cambio = (OR ajustado – OR crudo) / (OR crudo)

* si el cambio representa mayor a un 10% como regla general se considera que existe un efecto de confusión.

En T₀ se detectó que la variación del OR de categoría era 47% con respecto al crudo. Esto significa que existe evidencia de que el predio y la CC conjuntamente confunden la relación entre la categoría y la excreción de *Campylobacter* spp. También hay evidencia de que el predio y la CC independientemente confunden esta relación.

```
. logit campy categoria cc predio pc , or
```

```
Iteration 0: log likelihood = -32.256682
Iteration 1: log likelihood = -29.595033
Iteration 2: log likelihood = -29.381297
Iteration 3: log likelihood = -29.380686
Iteration 4: log likelihood = -29.380686
```

```
Logistic regression               Number of obs   =           71
                                LR chi2(4)         =           5.75
                                Prob > chi2         =          0.2185
Log likelihood = -29.380686       Pseudo R2        =          0.0892
```

campy	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
categoria	.2180457	.1837668	-1.81	0.071	.0417987	1.137449
cc	1.841379	1.55971	0.72	0.471	.3500637	9.685889
predio	.6231672	2.8407	-0.10	0.917	.0000821	4729.297
pc	1.636363	2.095515	0.38	0.701	.1329954	20.13365
_cons	.0221088	.0704869	-1.20	0.232	.0000427	11.43802

Note: _cons estimates baseline odds.

```
. logit campy categoria predio cc pc
```

```
Iteration 0: log likelihood = -32.256682
Iteration 1: log likelihood = -29.595033
Iteration 2: log likelihood = -29.381297
Iteration 3: log likelihood = -29.380686
Iteration 4: log likelihood = -29.380686
```

```
Logistic regression               Number of obs   =           71
                                LR chi2(4)         =           5.75
                                Prob > chi2         =          0.2185
Log likelihood = -29.380686       Pseudo R2        =          0.0892
```

campy	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
categoria	-1.523051	.8427905	-1.81	0.071	-3.17489	.1287884
predio	-.4729404	4.558488	-0.10	0.917	-9.407413	8.461532
cc	.610515	.8470335	0.72	0.471	-1.04964	2.27067
pc	.4924758	1.280593	0.38	0.701	-2.017441	3.002393
_cons	-3.81178	3.188183	-1.20	0.232	-10.0605	2.436943

Figura J1. Modelo de regresión en T0

T₁

```
. logit campy predio cc categoria pc ccat catpre precatcc
```

```
note: categoria != 0 predicts failure perfectly
      categoria dropped and 38 obs not used
```

```
note: ccat omitted because of collinearity
note: catpre omitted because of collinearity
note: precatcc omitted because of collinearity
Iteration 0:  log likelihood = -14.653224
Iteration 1:  log likelihood = -13.252726
Iteration 2:  log likelihood = -12.957092
Iteration 3:  log likelihood = -12.946441
Iteration 4:  log likelihood = -12.946379
Iteration 5:  log likelihood = -12.946379
```

Logistic regression	Number of obs	=	37
	LR chi2(3)	=	3.41
	Prob > chi2	=	0.3321
Log likelihood = -12.946379	Pseudo R2	=	0.1165

campy	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
predio	15.94316	16.72533	0.95	0.340	-16.83788	48.72421
cc	3.902117	4.261222	0.92	0.360	-4.449725	12.25396
categoria	0	(omitted)				
pc	-3.967007	4.526959	-0.88	0.381	-12.83968	4.90567
ccat	0	(omitted)				
catpre	0	(omitted)				
precatcc	0	(omitted)				
_cons	-16.98069	15.92983	-1.07	0.286	-48.20258	14.24121

Figura J2. Modelo saturado en T₁ con omisión por colinealidad de ausencia de *Campylobacter* y categoría= 1(ovejas)

T₂

Tabla J2. Evaluación de efecto de confusión en T₂

OR	Categoría	% variación con respecto al crudo
Modelo 1 saturado	0,27	8%
Modelo 2	0,28	12%
Modelo 3	0,22	12%
Modelo 4	0,22	12%
Modelo 5	0,22	12%
Modelo 6	0,27	8%
Modelo 7	0,22	12%
Modelo 8-crudo	0,25	-

$\% \text{ cambio} = (\text{OR ajustado} - \text{OR crudo}) / (\text{OR crudo})$

** si el cambio representa mayor a un 10% como regla general se considera que existe un efecto de confusión.

**se reconoce que no hay efecto de modificación entre las variables y la categoría. Por otra parte, sí existe efecto de confusión conjuntamente entre predio y CC, días de gestación y CC. También días de gestación por si sola es confusora.

```
. logit campy i.categoria i.predio c.gest c.cc i.predio#c.gest c.gest#c.cc i.predio#c.cc, c
```

```
Iteration 0: log likelihood = -37.836841
Iteration 1: log likelihood = -32.692943
Iteration 2: log likelihood = -32.399828
Iteration 3: log likelihood = -32.394565
Iteration 4: log likelihood = -32.394565
```

```
Logistic regression               Number of obs   =          61
                                LR chi2(7)         =         10.88
                                Prob > chi2         =         0.1437
Log likelihood = -32.394565       Pseudo R2      =         0.1438
```

campy	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
1.categoria	.2841711	.2166749	-1.65	0.099	.063761	1.266498
1.predio	896.1468	6860.307	0.89	0.375	.000273	2.94e+09
gest	.9712575	.2905902	-0.10	0.922	.5403357	1.745843
cc	3.581372	16.18552	0.28	0.778	.0005095	25173.25
predio#c.gest						
1	1.02105	.065704	0.32	0.746	.9000622	1.1583
c.gest#c.cc	1.004091	.079158	0.05	0.959	.8603364	1.171866
predio#c.cc						
1	.1558706	.348763	-0.83	0.406	.0019417	12.51242
_cons	.0081462	.1405604	-0.28	0.780	1.67e-17	3.96e+12

```
. logit campy i.categoria i.predio c.gest c.cc i.predio#c.gest c.gest#c.cc i.predio#c.cc
```

```
Iteration 0: log likelihood = -37.836841
Iteration 1: log likelihood = -32.692943
Iteration 2: log likelihood = -32.399828
Iteration 3: log likelihood = -32.394565
Iteration 4: log likelihood = -32.394565
```

```
Logistic regression               Number of obs   =          61
                                LR chi2(7)         =         10.88
                                Prob > chi2         =         0.1437
Log likelihood = -32.394565       Pseudo R2      =         0.1438
```

campy	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
1.categoria	-1.258179	.7624806	-1.65	0.099	-2.752613	.2362556
1.predio	6.798104	7.655339	0.89	0.375	-8.206084	21.80229
gest	-.0291637	.2991897	-0.10	0.922	-.6155647	.5572373
cc	1.275746	4.519364	0.28	0.778	-7.582046	10.13354
predio#c.gest						
1	.0208312	.0643494	0.32	0.746	-.1052914	.1469538
c.gest#c.cc	.0040828	.0788354	0.05	0.959	-.1504318	.1585975
predio#c.cc						
1	-1.858729	2.237516	-0.83	0.406	-6.24418	2.526722
_cons	-4.810205	17.25475	-0.28	0.780	-38.62888	29.00848

Figura J3. Modelo de regresión en T₂

T₃

Como hay evidencia de modificación entre categoría y predio, y gestación y predio, no se los evalúa como factores de confusión.

```
. logit campy predio gest categoria cc catpre gestpre, or
```

```
Iteration 0:  log likelihood = -31.576444
Iteration 1:  log likelihood = -22.408532
Iteration 2:  log likelihood = -21.752494
Iteration 3:  log likelihood = -21.738553
Iteration 4:  log likelihood = -21.738522
Iteration 5:  log likelihood = -21.738522
```

```
Logistic regression              Number of obs   =          53
                                LR chi2(6)         =         19.68
                                Prob > chi2         =         0.0032
Log likelihood = -21.738522      Pseudo R2       =         0.3116
```

campy	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
predio	4.42e-07	2.23e-06	-2.90	0.004	2.27e-11	.0086137
gest	1.137344	.065255	2.24	0.025	1.016376	1.27271
categoria	1.278978	1.445983	0.22	0.828	.1394806	11.72767
cc	.0330354	.0443443	-2.54	0.011	.002379	.4587427
catpre	48.11191	83.55214	2.23	0.026	1.599699	1446.995
gestpre	.7664446	.0768358	-2.65	0.008	.6297209	.9328534
_cons	1.63e+08	1.08e+09	2.86	0.004	384.9029	6.91e+13

Note: _cons estimates baseline odds.

```
. logit campy predio gest categoria cc catpre gestpre
```

```
Iteration 0:  log likelihood = -31.576444
Iteration 1:  log likelihood = -22.408532
Iteration 2:  log likelihood = -21.752494
Iteration 3:  log likelihood = -21.738553
Iteration 4:  log likelihood = -21.738522
Iteration 5:  log likelihood = -21.738522
```

```
Logistic regression              Number of obs   =          53
                                LR chi2(6)         =         19.68
                                Prob > chi2         =         0.0032
Log likelihood = -21.738522      Pseudo R2       =         0.3116
```

campy	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
predio	-14.63164	5.0395	-2.90	0.004	-24.50887	-4.754397
gest	.1286957	.0573749	2.24	0.025	.0162429	.2411485
categoria	.2460609	1.130577	0.22	0.828	-1.969829	2.461951
cc	-3.410174	1.342325	-2.54	0.011	-6.041083	-.7792658
catpre	3.87353	1.736621	2.23	0.026	.4698154	7.277244
gestpre	-.2659929	.1002496	-2.65	0.008	-.4624786	-.0695073
_cons	18.91013	6.610909	2.86	0.004	5.952991	31.86728

Figura J4. Modelo de regresión de T₃

T₄

Hay evidencia de modificación por la prueba de LrTest entonces se evalúa término por término

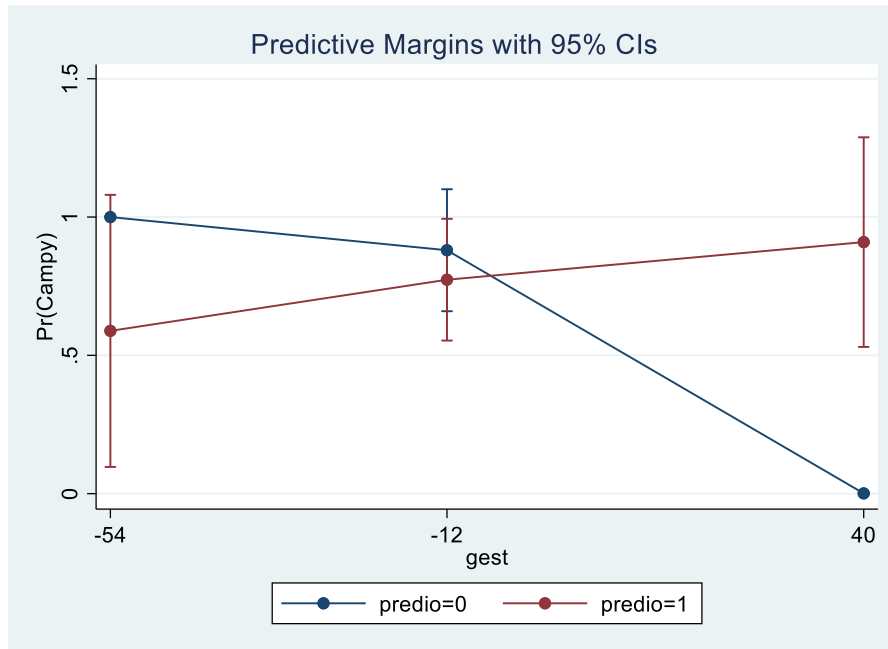


Figura J5. Gráfica de representación de efecto de interacción entre gestación y predio en T₄

. logit campy categoria gest predio gestpre, or

Iteration 0: log likelihood = -40.751596
 Iteration 1: log likelihood = -32.448744
 Iteration 2: log likelihood = -32.077887
 Iteration 3: log likelihood = -32.071222
 Iteration 4: log likelihood = -32.071219
 Iteration 5: log likelihood = -32.071219

Logistic regression	Number of obs	=	60
	LR chi2(4)	=	17.36
	Prob > chi2	=	0.0016
Log likelihood = -32.071219	Pseudo R2	=	0.2130

campy	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
categoria	1.2039	.7739117	0.29	0.773	.3415123	4.243991
gest	.8410914	.0620104	-2.35	0.019	.7279264	.9718493
predio	4.558345	5.198577	1.33	0.183	.4875868	42.61498
gestpre	1.213876	.0999719	2.35	0.019	1.032932	1.426518
_cons	.8577516	.474067	-0.28	0.781	.2903452	2.53401

Note: _cons estimates baseline odds.

. logit campy gest predio categoria gestpre

Iteration 0: log likelihood = -40.751596
 Iteration 1: log likelihood = -32.448744
 Iteration 2: log likelihood = -32.077887
 Iteration 3: log likelihood = -32.071222
 Iteration 4: log likelihood = -32.071219
 Iteration 5: log likelihood = -32.071219

Logistic regression	Number of obs	=	60
	LR chi2(4)	=	17.36
	Prob > chi2	=	0.0016
Log likelihood = -32.071219	Pseudo R2	=	0.2130

campy	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
gest	-.1730549	.0737261	-2.35	0.019	-.3175553	-.0285545
predio	1.51696	1.140453	1.33	0.183	-.7182869	3.752206
categoria	.1855662	.6428373	0.29	0.773	-1.074372	1.445504
gestpre	.1938188	.0823575	2.35	0.019	.032401	.3552366
_cons	-.1534407	.5526856	-0.28	0.781	-1.236685	.9298031

Figura J6. Modelo de regresión en T4