



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

**Estudio de resistencia a antimicrobianos en terneros de lechería en las  
Regiones de Los Ríos y de Los Lagos**

**Francisco Javier Astorga Jorquera**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: Luis Pablo Hervé Claude  
Universidad de Chile

Proyecto U-Inicia VID 121017019102106

SANTIAGO, CHILE  
2017



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

**Estudio de resistencia a antimicrobianos en terneros de lechería en las  
Regiones de Los Ríos y de Los Lagos**

**Francisco Javier Astorga Jorquera**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:.....

FIRMA

PROFESOR GUÍA: DR. LUIS PABLO HERVÉ CLAUDE .....

PROFESOR CORRECTOR: DR. CHRISTOPHER HAMILTON-WEST .....

PROFESOR CORRECTOR: DR. MARIO DUCHENS A .....

SANTIAGO, CHILE  
2017

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

A mi tata que ya no está con nosotros.

A todos mis amigos y familia que me acompañaron durante todo este proceso.

Gracias

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN .....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
Resistencia antimicrobiana .....	2
Evolución de la resistencia antimicrobiana .....	3
Situación mundial .....	3
Situación nacional.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
Obtención de las muestras .....	8
Encuesta.....	9
Aislamiento e identificación .....	10
Sensibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	11
Análisis de datos .....	12
RESULTADOS .....	14
DISCUSIÓN .....	20
Resistencia antimicrobiana .....	20
Factores de riesgo .....	23
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla Nro. 1:</b> Información colectada a partir de la encuesta, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.....	10
<b>Tabla Nro. 2:</b> Proporción de cepas resistentes de <i>E. coli</i> aisladas de heces de terneros probados con 7 antimicrobianos y cantidad de productores que utilizan cada antimicrobiano obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.....	14
<b>Tabla Nro. 3:</b> Porcentaje de cepas resistentes a uno o más antimicrobianos, obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile. ....	15
<b>Tabla Nro. 4:</b> Perfiles de resistencia de las cepas aisladas de terneros de lechería y terneras obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 lecherías del sur de Chile. ....	16
<b>Tabla Nro. 5:</b> Análisis univariado para variables estudiadas en encuesta.....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura Nro. 1:</b> Ubicación geográfica de los predios muestreados. Regiones de los Ríos y los Lagos .....	9
<b>Figura Nro. 2:</b> Promedios de resistencia de cada grupo de muestreo obtenidas en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.....	15

## RESUMEN

La resistencia a antimicrobianos es una de las amenazas más relevantes a la salud pública mundial. Actualmente es común encontrar bacterias multirresistente, con resistencia extrema e incluso panresistentes dejando escasas alternativas para el tratamiento de las infecciones.

Los animales son considerados como reservorios de resistencia a antimicrobianos, transfiriendo genes a otras bacterias patógenas que pueden afectar al ser humano. Es por esto que se han desarrollado diversos programas de vigilancia bajo el concepto “Una Salud”, utilizando bacterias comensales como *Escherichia coli* para monitorear los niveles de resistencia. El objetivo de este trabajo fue conocer el estado actual de resistencia antimicrobiana en terneros de lechería del sur de Chile, junto con determinar posibles factores de riesgo para la mantención de esta. Se recolectaron heces de terneros sanos, con diarrea y de las camas de las terneras de 20 predios y se les realizó cultivo para el aislamiento de *E. coli* y antibiograma con los 7 antimicrobianos más utilizados en bovinos según los reportes del SAG en el año 2015. Adicionalmente se aplicó una encuesta de manejos a los productores. Los resultados muestran que existen niveles elevados de resistencia (sobre el 20%) a oxitetraciclina, amoxicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, enrofloxacino y florfenicol, manteniendo bajos niveles de resistencia a gentamicina y ceftiofur. Los terneros con diarrea presentaron mayores niveles de multirresistencia y extrema resistencia. Además, se encontró que, del total de las muestras, un 18,9% de las muestras presentó resistencia a 5 o más antimicrobianos.

En relación con los factores de riesgo analizados a partir de la encuesta, no se encontró asociación entre las variables evaluadas y los niveles de resistencia. Por otra parte, se encontró que los terneros de menor edad tenían mayores niveles de resistencia que los terneros mayores ( $p < 0,001$ ).

El presente trabajo da cuenta de que existen elevados niveles de resistencia antimicrobiana en los terneros de lechería del sur del país, dejando en evidencia un problema serio y que requiere de acciones urgentes para enfrentarlo dado el potencial riesgo que representa para la salud pública.

**Palabras clave:** Resistencia antimicrobianos, Terneros de lechería, Factores de riesgo, *E. coli*.

## **ABSTRACT**

Antimicrobial resistance is one of the most significant threats to global public health. It is now common to find multiresistant bacteria and even extreme resistance leaving few alternatives for the treatment of infections.

Livestock are considered as reservoirs of resistance, transferring genes to other pathogenic bacteria that can even affect the human population. Therefore, several surveillance programs have been developed under the "One Health" concept, using commensal bacteria like *E. coli* to monitor the resistance levels. Calves found in dairy systems are not exempt from the problem, and it is suggested that there are factors involved in the maintenance and diffusion of resistance. The objective of this work was to assess the current state of antimicrobial resistance in dairy calves of southern Chile and to determine possible risk factors associated with it. Twenty fecal samples were collected from healthy calves, calves with diarrhea and from the closer environment. These were cultured and an antimicrobial resistance testing was performed. A questionnaire was also applied to all the participating producers.

The results show that there are high levels of resistance to oxytetracycline, amoxicillin, sulfamethoxazole-trimethoprim, enrofloxacin and ceftiofur, but maintaining low levels of resistance to gentamicin and florfenicol. Calves with diarrhea presented higher levels of resistance and multiresistance. In addition, it was found that 18.9% of the samples presented resistance to 5 or more antimicrobials.

In relation to the risk factors evaluated through the questionnaire thought to be involved in the observed antimicrobial resistance levels, none showed statistically significant association. Nevertheless, it was found that younger calves had higher levels of resistance than the older calves ( $p < 0,001$ ).

The present work allowed to describe the actual situation on *E. coli* antimicrobial resistance in dairy calves in southern Chile and defined which are the potentially relevant elements that can participate in the antimicrobial resistance in this complex environment.

**Key words:** Antimicrobial resistance, Dairy calves, Risk factors, *E. coli*.

## **INTRODUCCIÓN**

Según ODEPA (2016), en Chile existen actualmente alrededor de 500.000 cabezas de ganado destinadas a la producción lechera, concentrándose principalmente en las regiones de Los Ríos y Los Lagos. En estos sistemas, se utilizan diversos antibióticos para tratar enfermedades prevalentes en los rebaños, como las mastitis, diarreas y neumonías, siendo usados generalmente sin supervisión directa del Médico Veterinario.

La resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de una bacteria de soportar los efectos de un antibiótico destinado a eliminarla o controlarla (Labro y Bryskier, 2014). Actualmente se ha convertido en una gran amenaza a la salud pública mundial, ya que pone en peligro la eficacia de los programas de salud, tanto para los humanos como para los animales. Esta problemática es de carácter complejo y multifactorial dados los diversos actores que juegan un rol tanto en su generación, como su mantención y propagación (Landers *et al.*, 2012)

Los sistemas de producción pecuaria alrededor del mundo se han visto enfrentados a problemas en las últimas décadas, producto de que los antibióticos ya no poseen los efectos esperados para tratar las enfermedades más comunes en los animales. Debido a esto, varios países ya están actuando al respecto, elaborando programas para el uso responsable de antibióticos, junto con prohibir su distribución de manera inapropiada y mejorando las prácticas para prevenir la transmisión de enfermedades, además de instaurar programas activos de vigilancia de cepas resistentes utilizando *Escherichia coli* generalmente como bacteria indicadora dadas sus características de ubicuidad y relativa facilidad de aislamiento. Junto a lo anterior también se han elaborado planes de acción en el ámbito animal, todo esto bajo el concepto de “un mundo, una salud” (WHO, 2014).

Es por esto, que el objetivo del presente estudio fue conocer los patrones de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de heces de terneros de lecherías de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos, junto con determinar cómo algunos de los manejos más comunes podrían ser posibles factores de riesgos para la mantención y difusión de la resistencia en los terneros.



## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Resistencia antimicrobiana**

Si bien el descubrimiento de los antimicrobianos es uno de los grandes avances de la medicina moderna, la generación de la resistencia a éstos es una de las amenazas existentes más considerable a la salud pública mundial (Gottlieb y Nimmo, 2011), sobre todo considerando que existe un gran potencial de transferencia a través de la cadena de alimentos hacia los seres humanos (Soulsby, 2007). Este problema ha adquirido gran importancia, ya que, en el contexto de un mundo globalizado, cualquier país es vulnerable a enfermedades producidas en otros territorios, debido al fácil traspaso de bacterias resistentes de una parte del mundo a otra (Smith y Coast, 2002).

La resistencia antimicrobiana se puede definir como la capacidad que posee un organismo de resistir la actividad bactericida o bacteriostática de un agente antimicrobiano (Labro y Bryskier, 2014), esto implica que la bacteria no detendrá su actividad de multiplicarse y propagarse en un organismo por el efecto de dicho tratamiento (CDC, 2015).

La resistencia por parte de una bacteria puede ser innata o adquirida. En la primera, el antimicrobiano no tendrá ningún efecto sobre ésta, ya que posee resistencia constitutiva, es decir, la bacteria no posee el receptor, o este no es adecuado para que el antimicrobiano haga su efecto (Errecalde, 2004). De mayor preocupación es la resistencia adquirida, en la cual inicialmente existe una población bacteriana susceptible que se vuelve resistente bajo condiciones específicas (Labro y Bryskier, 2014). Este tipo de resistencia se puede producir por diferentes mecanismos, ya sea a través de la incorporación de genes que codifiquen enzimas específicas (Tenover, 2006), bombas de eflujo (Becerra *et al.*, 2009) o mutaciones que modifiquen el sitio de unión del antibiótico o que impidan su ingreso a la célula (Giedraitiene *et al.*, 2011). Además de esto, la difusión de esta resistencia adquirida a otras bacterias se produce principalmente a través de mecanismos de conjugación, ya sea mediante plásmidos, transposones o integrones, los cuales pueden portar incluso más de un gen de resistencia (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

## **Evolución de la resistencia antimicrobiana**

El uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto para medicina humana como veterinaria ha generado una presión selectiva para la evolución bacteriana. Es así como los antimicrobianos son usados en gran cantidad para terapias, profilaxis e incluso como promotores del crecimiento en animales (Aarestrup *et al.*, 1998). Esto permite que las bacterias estén sometidas constantemente a un ambiente con concentraciones sub inhibitorias de drogas, lo que desempeña un papel fundamental en la aparición y propagación de la resistencia favoreciendo la selección de este tipo de bacterias. Junto con lo anterior, la mantención en el entorno de los animales a concentraciones residuales de antibióticos conlleva a un aumento en la mutagénesis y la recombinación, lo que puede influir en diversos procesos fisiológicos de la bacteria como un aumento en la virulencia o la capacidad de generar biofilms (Andersson y Hughes, 2014).

A raíz de todo esto y con el paso del tiempo los patrones de resistencia que se conocían a un único tipo de antibiótico han evolucionado, hoy en día es común encontrar cepas multirresistentes (resistencia por lo menos a un agente antimicrobiano de 3 familias distintas), con extrema resistencia (sensibles a 1 o 2 antimicrobianos de familias distintas) e incluso cepas panresistentes (Magiorakos *et al.*, 2011; WHO, 2014), en que prácticamente las bacterias no son susceptibles a ningún antibiótico, dejando escasas alternativas para el tratamiento de las infecciones, en donde a menudo terminan progresando a cuadros más graves (Labarca y Araos, 2009). Por ejemplo, estudios han detectado resistencia contra antimicrobianos considerados como “última línea de ataque”, como lo es el caso de bacterias productoras de carbapenemasas (Guerra *et al.*, 2014) o resistentes a la colistina (Du *et al.*, 2016).

## **Situación mundial**

A nivel mundial, el problema de resistencia en la producción animal es un tema de preocupación, ya que hay varios estudios que indican que los animales constituyen una importante reserva de bacterias resistentes (Catry *et al.*, 2003; Mathew *et al.*, 2007). Estos reservorios de resistencia están en constante comunicación con el ecosistema, facilitando la difusión de resistencia a otras bacterias patógenas que afecten a humanos, como también el traspaso a otros animales y el medio ambiente (Witte, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) han trabajado estrechamente para combatir el problema de resistencia antimicrobiana, tanto en los humanos como animales (Labro y Bryskier, 2014), todo esto bajo el concepto “*One Health*”, ampliamente discutido en las últimas décadas (Madoff, 2006). Varios países, entre ellos Dinamarca, Suecia, Noruega, Holanda, Canadá y Estados Unidos (Dargatz y Fedroka-Cray, 2007; Hammerun *et al.*, 2007; Deckert *et al.*, 2010; Björn *et al.*, 2012; Maran, 2013; Norm/Norm-Vet, 2013), ya han desarrollado programas de monitoreo de resistencia junto con programas de control tanto en humanos como animales y/o alimentos (WHO, 2014).

La mayoría de estos programas de vigilancia utilizan *Escherichia coli* como cepa reveladora de resistencia, ya que es buena indicadora de las bacterias Gram negativas, dadas sus características de ser un microorganismo que se puede aislar e identificar con frecuencia (Moreno *et al.*, 2000). Además, poseen naturaleza ubicua, pudiendo encontrarse fácilmente tanto en los animales, alimentos, como en los seres humanos (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Asimismo, tienen una gran capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos en respuesta a una presión selectiva y posteriormente transferir esta resistencia a otras bacterias o cepas patógenas (DANMAP, 2013). Junto con todo lo anterior, la vigilancia de resistencia en bacterias indicadoras obtenidas de animales sanos cumple con el objetivo de evitar errores en la estimación de los niveles de resistencia, ya que, al realizar esta vigilancia en bacterias patógenas aisladas de animales que hayan sido previamente tratados, la interpretación de los patrones de susceptibilidad puede ser alterada (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Mathew *et al.*, 2007).

En los sistemas de producción animal, los cuales son cada vez más intensivos, existe un estrecho contacto entre los animales, en donde muchas veces los tratamientos se hacen bajo condiciones en que se desconoce el agente causal, o su sensibilidad frente al antimicrobiano, favoreciendo la presión selectiva de bacterias y su rápida difusión a los otros animales (San Martín y Cañón, 2000). En un estudio realizado por Addis *et al.* (2011), se determinaron elevados niveles de resistencia a los antimicrobianos más frecuentemente utilizados en el sistema, en cepas de *Salmonella* en terneros de lecherías y en los trabajadores asociados a

éstas, donde se encontraron niveles de resistencia sobre un 20% a antibióticos como ampicilina, estreptomicina, kanamicina y tetraciclinas. Esto demuestra, además, que existe una relación entre el uso de antibióticos en el ganado y el incremento de la prevalencia de organismos resistentes asociados a estos animales, los trabajadores del sistema, el medio ambiente e incluso en productos agrícolas (McEwen y Fedorka-Cray, 2002; Witte, 2000).

En lecherías, los antimicrobianos son principalmente utilizados con fines terapéuticos para tratar los cuadros más comunes, como mastitis en vacas, enfermedades respiratorias y diarreas en terneros (Mathew *et al.*, 2007). Entre los fármacos utilizados comúnmente se encuentran:  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas y pirlimicina para los casos de mastitis, mientras que para el tratamiento de enfermedades respiratorias y diarreas los agentes más frecuentes son: aminoglucósidos, cefalosporinas, florfenicol, fluoroquinolonas sulfonamidas y tetraciclinas (San Martín *et al.*, 2003).

### **Situación nacional**

En Chile, estudios indican la presencia de bacterias resistentes y multirresistentes en el ganado lechero tanto en zona central como zona sur (San Martín *et al.*, 2002; San Martín *et al.*, 2003; San Martín *et al.*, 2005; Mella *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2013; Hervé *et al.*, 2015). El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) contempla dentro de sus normas la venta de antibióticos de uso veterinario con receta no retenida, pero éstos en los predios, generalmente son utilizados sin la supervisión de un profesional (San Martín *et al.*, 2005; SAG, 2016). Recientemente se ha aprobado en Chile el “Plan nacional contra la resistencia a los antimicrobianos”, el que pretende abordar de manera integral la problemática en el país (MINSAL, 2017).

Dados los antecedentes anteriormente expuestos, se ha identificado al uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos como el principal responsable de la aparición y mantención de resistencia (Van den Bogaard and Stobberingh, 2000). Aun así, estudios han demostrado la existencia de factores de riesgo adicionales involucrados en la mantención y propagación de resistencia, tal como la alimentación de terneros con leche de vacas enfermas o tratadas en que existe un traspaso de genes de resistencia desde la leche a los terneros, el uso de fluoroquinolonas en estas, en donde aumentarían considerablemente los niveles de resistencia en los terneros menores a un mes, o tamaño de los rebaños en donde existe mayor

tasa de contacto y mayores posibilidades de difusión de la resistencia, (Pereira *et al.*, 2014; Duse *et al.*, 2015). Lo anteriormente mencionado expone las bases para considerar la existencia de más factores de riesgo propios del manejo habitual de los terneros, que podrían jugar un rol en la mantención y propagación de resistencia en los predios.

Esta memoria de título busca conocer el estado actual de resistencia antimicrobiana en terneros de lecherías del sur de Chile, junto con determinar factores de riesgo asociados a los manejos que puedan estar implicados en la mantención y propagación de resistencia.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la resistencia a antimicrobianos, los principales manejos y su relación como factores de riesgo asociados a la mantención y propagación de la resistencia en terneros de lechería de las Regiones de Los Ríos y Los Lagos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* aisladas de terneros de lechería de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos.
2. Determinar si algunos de los principales manejos de los terneros actúan como factores de riesgo para la mantención y propagación de resistencia en los terneros en el sur de Chile.

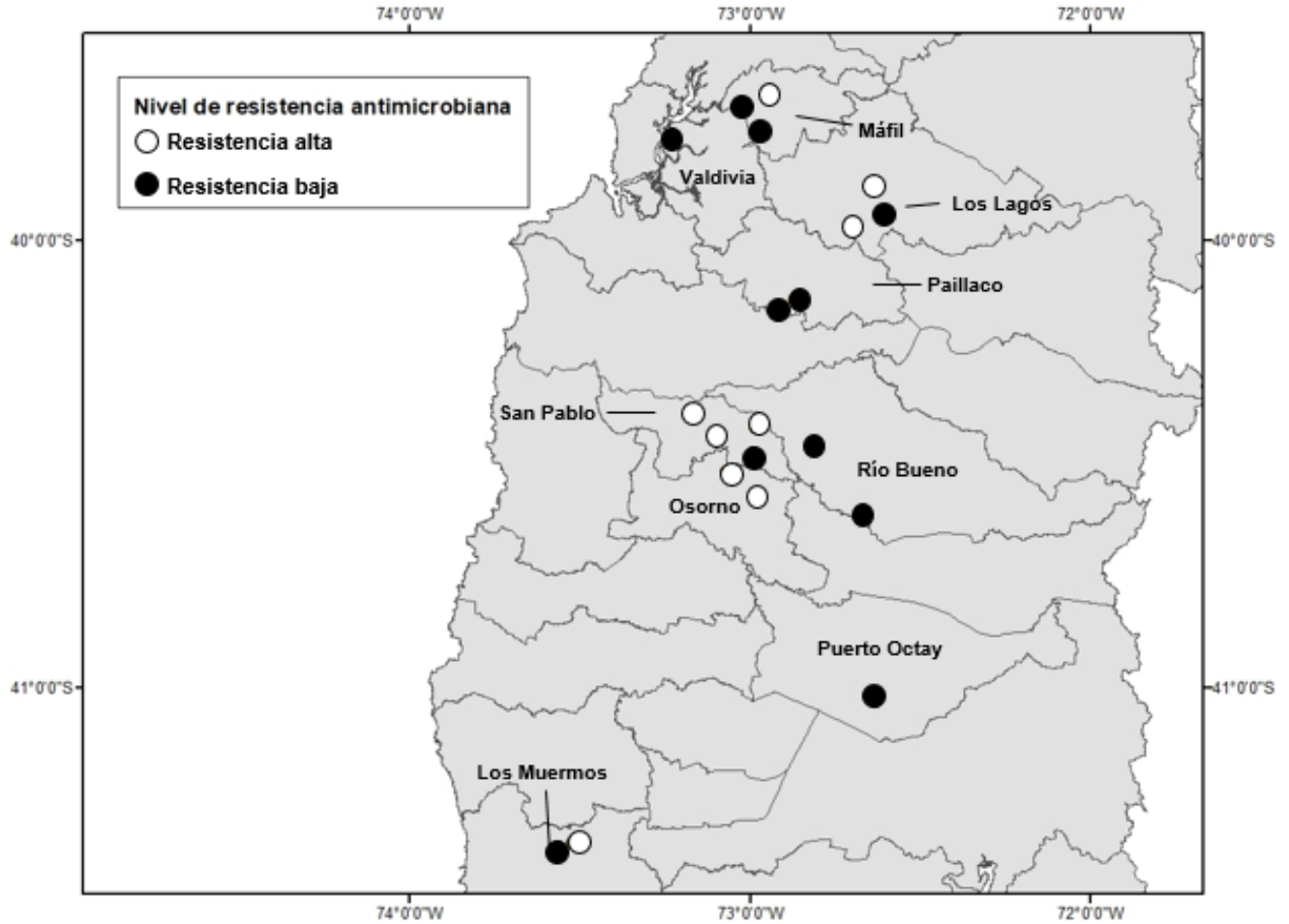
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras**

Se seleccionaron 20 lecherías ubicadas entre las regiones de Los Ríos y Los Lagos (Figura nro. 1). Estas fueron escogidas a través de un muestreo por conveniencia, de predios que manifestaron su interés en participar de este proyecto piloto con consentimiento informado (Anexo 1) y que además presentaron casos de diarreas. Se obtuvieron 20 muestras de cada predio. De ellas, 10 fueron muestras de heces de terneros con diarrea que no habían recibido tratamiento antimicrobiano (a través de un muestreo dirigido), cinco de heces de terneros clínicamente sanos, elegidos aleatoriamente y otras cinco muestras obtenidas de las camas de los terneros, también elegidas aleatoriamente. Cada muestra obtenida fue registrada en la planilla de identificación individual detallada en el Anexo 2.

Las muestras fueron tomadas mediante palpación rectal y depositadas en tubos estériles de 50 ml para su posterior transporte al laboratorio. Este procedimiento se realizó conforme a las normas de bioética entregadas por la OIE (2015a) en su código sanitario para animales terrestres (Anexo 3). Además, para la recolección del material fecal, se consideraron medidas de bioseguridad básicas, debido al potencial zoonótico de algunas bacterias, por lo que todas las muestras fueron recolectadas con guantes de látex desechables, siendo obligatorio el lavado de manos con jabón desinfectante antes y después de cada recolección.

Una vez recolectadas las muestras, estas fueron almacenadas en frío y trasladadas inmediatamente al Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.



**Figura Nro. 1:** Ubicación geográfica de los predios muestreados. Regiones de Los Ríos y Los Lagos, Chile.

### Encuesta

Se elaboró una encuesta utilizando la plataforma Microsoft Excel® en la cual se identificaron todos los datos del predio, junto con todos los manejos y factores asociados a los terneros, incluyendo la utilización de antimicrobianos (Anexo 4). La encuesta epidemiológica incluye las siguientes secciones: información predial, infraestructura, manejos prediales y uso de antimicrobianos. La información recolectada se clasificó según lo detallado en la tabla nro 1.



**Tabla Nro. 1:** Información colectada a partir de la encuesta, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.

<b>Variables</b>	<b>Categorías</b>
<b>Información predial</b>	
Nombre encuestado	Respuesta abierta
Nombre predio	Respuesta abierta
RUP del predio	Numero único de 9 dígitos
Latitud	Grados decimales
Longitud	Grados decimales
Superficie	Hectáreas destinadas al sistema de producción
Total Bovinos	Número total de bovinos de todas las categorías en el predio
Vacas en leche	Número de vacas en producción al momento de la encuesta
Total terneros	Número de terneros con dieta láctea en el predio
<b>Infraestructura</b>	
Tipo terneras	Grupales - Individuales
Tamaño por grupo	Número de animales
Número de grupos	Cantidad de grupos dentro de la misma unidad
Largo corral	Mts.
Ancho corral	Mts.
Material corral	Madera - Plástico - Metal
Aseo terneras	< 3 veces por semana - $\geq 3$ veces por semana
Material camas	Paja - Arena - Otro
Recambio Cama	Más de una vez por semana - Semanal - Mensual - Fin del ciclo
Material piso	Tierra - Radier - Madera - Otro
<b>Manejos</b>	
Estacionalidad de partos	Si - No
Sexo de terneros	Solo hembras - Machos y hembras
Litros de calostro	<2 - más de 2 y menos de 4 - más de 4 y menos de 6 - <i>ad libitum</i>
Tipo de calostro	Pool fresco - Pool congelado - Madre - Sustituto
Alimentación terneros	Sustituto - Leche descarte - Leche fresca
Tipo alimentador	Mamaderas individuales - Mamaderas grupales - Automático
Uso de antimicrobianos	Nombre comercial, Principio activo, Uso.

### **Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento e identificación de *E. coli* se utilizó un asa estéril de 10 µL y se sembró por estrías cada una de las muestras. Se utilizó un medio de cultivo selectivo (Agar MacConkey BD<sup>®</sup>) y agar sangre con 5% de sangre de cordero desfibrinada para la detección de cepas hemolíticas. Las muestras se incubaron en aerobiosis a 35° C ±2° C durante 24 a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se identificaron las colonias sospechosas lactosa positiva del agar MacConkey que presentaron un color rosado brillante y posteriormente se traspasaron un cultivo puro en agar sangre.

Para la identificación fenotípica se utilizó una batería bioquímica que incluye los siguientes medios: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Agar Lisina hierro (LIA), Medio Motilidad, Indol y Ornitina (MIO), Agar Citrato-Simmons y Agar Urea. La lectura se realizó utilizando el protocolo del Manual de Bergey's (Scheutz y Strockbine, 2005) (Anexo 5).

### **Sensibilidad antimicrobiana *in vitro***

Una vez obtenidas e identificadas las cepas, se realizó la medición de la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* utilizando el método de difusión por disco (Kirby-Bauer) en agar Mueller-Hinton de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Se utilizaron siete sensidiscos (OXOID<sup>®</sup>), impregnados de los antimicrobianos que son más frecuentemente utilizados en lecherías según los reportes de venta de antibióticos del Servicio Agrícola y Ganadero (2015) (Anexo 6).

Para cada cepa aislada, se preparó en un tubo de ensayo una suspensión de colonias provenientes del cultivo puro con una solución salina al 0,85%. Esta suspensión se ajustó visualmente a una turbidez de 0,5 McFarland, la cual se inoculó posteriormente con una tórula estéril embebida de la suspensión en una placa de 90 mm de diámetro con el agar Mueller-Hinton en tres direcciones distintas.

Luego de la inoculación y difusión de la suspensión en la placa, se procedió a poner los siete sensidiscos manualmente con una pinza estéril a una distancia equidistante entre ellos para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Las placas se incubaron a 35° C ± 2° C durante 16 a 18 horas antes de la lectura de los halos de inhibición con un pie de metro.

La lectura de las placas y el proceso de aislamiento e identificación de las cepas se realizó utilizando como control positivo la cepa de referencia *E. coli* ATCC® 25922. Los resultados pueden interpretarse como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de acuerdo con los patrones estandarizados de cada antimicrobiano (CLSI, 2015). Para efectos de este estudio, las cepas que indicaron sensibilidad intermedia fueron consideradas como resistentes (Anexo 6).

Para la división de las distintas categorías de resistencia se consideraron como cepas sensibles las que no presentaron características de resistencia frente a ningún antimicrobiano, se clasificó como resistentes a las cepas que tuvieron resistencia hasta dos antimicrobianos, multirresistentes a las cepas que fueron resistentes a tres o más antimicrobianos, de resistencia extrema a las que fueron sensibles a 2 o menos antimicrobianos y panresistentes a las que no fueron sensibles a ningún antimicrobiano.

### **Análisis de datos**

Se realizó un análisis descriptivo para todas las variables consideradas en la encuesta, ya sean éstas del tipo cualitativo o cuantitativo. Se generó una base de datos integrada que considera la información microbiológica y la epidemiológica con el fin de poder cruzar todos los resultados del estudio. Se utilizó el Software InfoStat® versión estudiantil 2016 y todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

Luego, en base a los resultados microbiológicos de cada muestra, se obtuvo un puntaje por cada antimicrobiano analizado (puntaje 0 denota sensibilidad y 1 resistencia). Los siete resultados para cada aislado fueron sumados generándose un total por cada muestra. Este valor se promedió con los otros aislados del mismo predio obteniéndose una media por lechería. Dado que no existe consenso entre los distintos autores al momento de analizar y catalogar la resistencia antimicrobiana (Duse *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2014), se determinó clasificar los predios según la distribución bimodal de los promedios de resistencia obtenidas, así los predios con niveles sobre un 40% de resistencia se clasificaron como predios con "resistencia alta" mientras que los inferiores a este promedio como predios con "resistencia baja".

Utilizando el mismo sistema de puntajes mencionado, se elaboró un promedio de resistencia por las distintas categorías de animales muestreados (Diarrea, Sanos y ambientales).

Utilizando la información microbiológica y de las encuestas, se buscó identificar los potenciales factores de riesgo asociados al nivel resistencia a través de análisis univariados. Se descartó la construcción de un modelo epidemiológico debido al bajo tamaño de muestra (n=20 encuestas). Para las variables que presentaron una distribución normal, se les realizó un análisis de varianza, en tanto a las variables de distribución no normal, se les aplicó un análisis de varianza no paramétrico con la prueba de Kruskal - Wallis. A las variables de tipo categóricas se les realizó una prueba de  $\chi$ -cuadrado. Se seleccionaron como Factores de riesgo a considerar las variables con significancia  $p < 0,05$ . Estos resultados expondrán los criterios a considerar en posteriores estudios donde se requiera evaluar factores de riesgo con mayor profundidad.

## RESULTADOS

De las 400 muestras recolectadas, se lograron aislar 349 cepas de *E. coli*, de las cuales 194/200 corresponden al grupo de animales con diarrea, 96/100 al grupo de animales sanos y 59/100 a las ambientales. El restante de las muestras fue descartado por problemas en el aislamiento e identificación de las cepas (no hubo crecimiento de *E. coli* o hubo un sobre crecimiento de *Proteus spp.*).

Los antimicrobianos más utilizados por parte de los productores fueron enrofloxacino y florfenicol, en tanto que los que mayores niveles de resistencia presentados fueron amoxicilina y oxitetraciclina (Tabla Nro. 2).

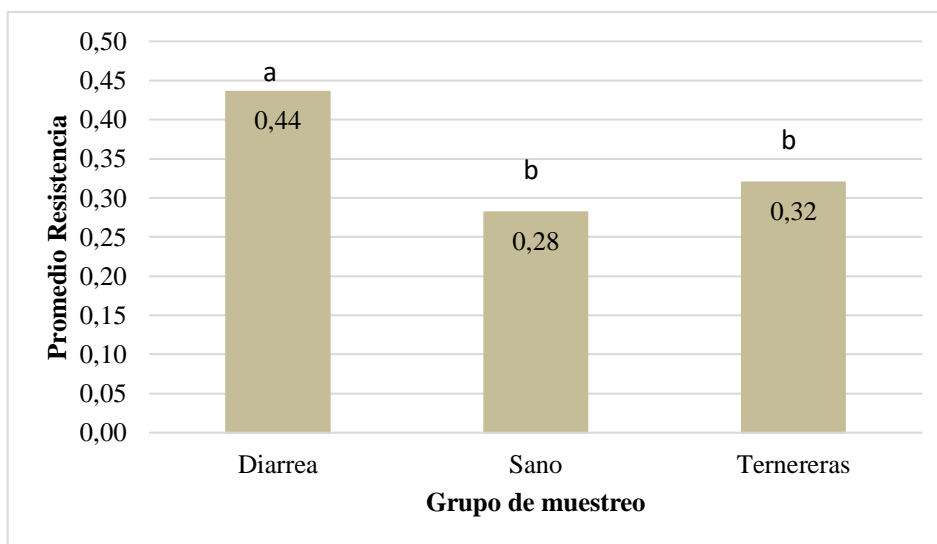
**Tabla Nro. 2:** Proporción de cepas resistentes de *E. coli* aisladas de heces de terneros probados con 7 antimicrobianos y cantidad de productores que utilizan cada antimicrobiano obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.

Antimicrobiano	Punto de corte <sup>1</sup> ( $\geq$ /mm)	Resistencia (%)	Productores que usan el antimicrobiano <sup>2</sup>
Gentamicina	16	7,2	1
Ceftiofur	21	18,3	2
Florfenicol	22	25,5	10
Enrofloxacino	23	27,5	13
Sulfametoxazol/trimetoprim	16	37,5	9
Oxitetraciclina	16	53,6	9
Amoxicilina	22	92,0	1

<sup>1</sup> Punto de corte según las pautas entregadas por CLSI.

<sup>2</sup> Cantidad de productores que reportaron tener estos antimicrobianos disponibles solo para los terneros.

Entre las muestras aisladas de los grupos de animales con diarrea, sanos y las muestras de las terneras, hubo algunas diferencias entre las proporciones de resistencia obtenidas de cada grupo. La Figura Nro. 2 muestra que los animales con diarrea presentaron mayor proporción de resistencias en comparación con los animales sanos y las muestras ambientales ( $p < 0,0001$ ), esto a su vez está dado por una mayor proporción de cepas multirresistentes y con extrema resistencia en el grupo de animales enfermos.



\* Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ )

**Figura Nro. 2:** Promedios de resistencia de cada grupo de muestreo obtenidas en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.

Al explorar la correlación entre las variables edad y resistencia promedio, se encontró que existía una correlación negativa moderada (Coeficiente de correlación de Spearman = -0.3,  $p < 0,001$ ). Es decir, los terneros más jóvenes (Menores de 21 días) presentaron mayores niveles de resistencia que los terneros mayores (Hasta 60 días).

Del total de cepas aisladas, un 95,3% presentaron resistencia por lo menos a un antimicrobiano, mientras que un 43,5% fue resistente a tres o más antibióticos (multiresistencia), un 18,9% a cinco o más (extrema resistencia) y un 2,3% fueron resistentes a todos los antimicrobianos probados (posibles pan resistentes). Se destaca además, una mayor proporción de cepas multiresistentes y extremo resistentes en el grupo de animales con diarrea (Tabla Nro. 3).

**Tabla Nro. 3:** Porcentaje de cepas resistentes a uno o más antimicrobianos, obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 terneras de lecherías en el sur de Chile.

Número de antimicrobianos	1	2	3	4	5	6	7
Diarrea	23%	19%	13%	17%	16%	6%	3%
Sano	46%	18%	8%	10%	7%	2%	0%
Ambiental	47%	19%	5%	12%	8%	2%	3%
Promedio	33,5%	18,3%	10,3%	14,3%	12,6%	4%	2,3%

Dentro de los perfiles de resistencia más frecuentemente aislados, (Tabla Nro. 4), se observa que predomina la resistencia a la amoxicilina, mientras que para los perfiles de multiresistencia y extrema resistencia se destaca la constante repetición de los patrones de Amoxicilina, Oxitetraclina y Sulfametoxazol-Trimetoprim.

**Tabla Nro. 4:** Perfiles de resistencia de las cepas aisladas de terneros de lechería y terneras obtenidas de los distintos grupos de muestreo, en 20 lecherías del sur de Chile.

Perfil de resistencia	% de cepas	Nº de cepas
Cef;Enr;Amx;SxT;Gen;Flo;Oxt	2,30%	8
Enr;Amx;SxT;Gen;Flo;Oxt	1,40%	5
Cef;Enr;Amx;SxT;Gen;Flo	1,10%	4
Cef;Enr;SxT;Gen;Flo;Oxt	1,10%	4
Cef;Enr;Amx;SxT;Gen;Oxt	0,30%	1
Enr;Amx;SxT;Flo;Oxt	6,30%	22
Cef;Enr;Amx;SxT;Oxt	3,70%	13
Cef;Amx;SxT;Flo;Oxt	1,10%	4
Amx;SxT;Gen;Flo;Oxt	0,90%	3
Cef;Enr;Amx;SxT;Flo	0,30%	1
Enr;Amx;Gen;Flo;Oxt	0,30%	1
Enr;Amx;SxT;Oxt	5,20%	18
Amx;SxT;Flo;Oxt	3,40%	12
Cef;Amx;SxT;Oxt	2,60%	9
Enr;Amx;Flo;Oxt	1,70%	6
Amx;SxT;Gen;Flo	0,90%	3
Cef;Enr;Amx;Oxt	0,60%	2
Amx;SxT;Oxt	6,00%	21
Amx;Flo;Oxt	1,40%	5
Cef;Enr;Amx	0,90%	3
Enr;Amx;Oxt	0,60%	2
Cef;Amx;SxT	0,30%	1
Cef;Amx;Flo	0,30%	1
Enr;Amx;Flo	0,30%	1
Amx;SxT;Flo	0,30%	1
Cef;Amx;Oxt	0,30%	1
Amx;Oxt	11,70%	41
Cef;Amx	3,40%	12
Amx;Flo	1,40%	5
Enr;Amx	1,10%	4
Enr;Flo	0,30%	1
SxT;Flo	0,30%	1
Amx	30,70%	107
Oxt	2,60%	9
Flo	0,30%	1

Amx: Amoxicilina, Oxt: Oxitetraclina, SxT: Sulfametoxazol/Trimetoprim, Enr: Enrofloxacino, Flo: Florfenicol, Gen: Gentamicina.

En cuanto a los resultados de la encuesta, los predios presentaron un rango entre 21 hasta 305 terneros, con una media de 145.

Se evidenció que un 75% de los productores realizaban algún manejo estacional de partos concentrándolos principalmente en otoño y primavera. En tanto, un 50% afirmó suministrar leche de descarte ya sea sola o mezclada en el momento de la encuesta. Sin embargo, no se pudieron obtener las proporciones y cantidades aproximadas de leche que se administraban a los terneros, ya que ninguno de los predios contaba con registros en este ítem.

Un 65% de los productores criaba a los terneros en corrales grupales desde el nacimiento, mientras que los restantes realizaban una crianza individual en periodos que variaban generalmente entre 1 a 2 semanas y luego pasaban a corrales grupales. La forma de suministrar la leche a los terneros era principalmente con mamaderas grupales (75%) mientras que algunos disponían de sistemas de alimentación completamente automatizados (25%).

Respecto al manejo del calostro, un 60% de los productores dejaba al ternero con la madre para realizar la ingesta de forma natural, en tanto los demás lo suministraban de forma manual en cantidades variables.

Se analizó la densidad animal, en la cual se reportó una media de 2,75 mts<sup>2</sup> por ternero, y un rango entre 1,23 mts<sup>2</sup> y 7,20 mts<sup>2</sup> por animal. La cantidad de tratamientos disponibles fue otra de las variables analizadas, teniendo como resultado que en cada ternera se manejan alrededor de 3 antimicrobianos distintos, reportando productores que tenían un solo fármaco disponible, hasta otros con cinco antimicrobianos distintos. En la Tabla Nro. 1 se muestran los antimicrobianos disponibles reportados por los productores. Los detalles de los resultados de la encuesta se encuentran en el anexo 7.

Por último, de los respectivos análisis univariados (Tabla Nro. 5), no se obtuvieron resultados significativos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, se consideraron como variables relevantes a discutir: Estacionalidad ( $P = 0,07$ ), en la cual los predios que mantenían partos durante todo el año tendieron presentar mayor resistencia que los predios que concentraban las pariciones en ciertos periodos Tipo de alimentador ( $P = 0,19$ ), en el cual los predios que utilizaban sistemas completamente automáticos de alimentación tendieron a presentar niveles bajos de



resistencia, mientras que en los que utilizaban mamaderas grupales solo la mitad presentaron estos mismos niveles. el tipo de ternera (P = 0,28), en que los sistemas que manejan solamente terneras grupales presentaron mayor resistencia que los que tienen sistemas mixtos con una primera etapa en terneras individuales y posteriormente grupales. Densidad animal (P = 0,29), en donde a mayor concentración de animales, se presentaron mayores niveles de resistencia y Litros de calostro (P = 0,37), en que los terneros alimentados con una cantidad  $\leq 4$  litros de calostro mostraron una mayor tendencia a tener elevados niveles de resistencia que terneros que recibieron una cantidad mayor o *ad libitum* de calostro.

**Tabla Nro. 5:** Análisis univariado para variables estudiadas en encuesta

<b>Variable</b>	<b>Categoría o valores</b>	<b>p-Value</b>
Alimentación	0: Leche descarte <sup>1</sup> 1: Sustituto Lácteo 2: Leche fresca	0,42
Aseo ternera	0: Frecuente (Más de tres veces por semana); 1: Infrecuente (Menos de tres veces por semana)	0,89
Cantidad de terneros	20-350	0,65
Densidad	1,0-5,0	0,29
Estacionalidad	0: Si 1: No	0,07
Litros de calostro	0: Ad Libitum 1: 1-2 2: 3-4 3: 5-6	0,37
Material ternera	ME: Metal MA: Madera	0,51
Origen calostro	0: Madre 1: Pool Fresco	0,44
Recambio cama	0: Frecuente (Tres o más veces por semana) 1: Infrecuente (Menos de tres veces por semana)	0,89
Tipo de alimentador	0: Automático 1: Mamaderas Grupales	0,19
Tipo suelo	0: Material orgánico (madera, tierra) 1: Radier	0,50
Tipo ternera	0: Grupales 1: Mixtas	0,28
Antimicrobianos disponibles	1-7	0,82

<sup>1</sup>Se consideró dentro de este grupo a cualquier tipo de dieta que incluyera leche de descarte.

## DISCUSIÓN

### Resistencia antimicrobiana

Los resultados de resistencia obtenidos en el presente trabajo no son totalmente comparables con otros estudios, dadas las distintas metodologías y técnicas utilizadas, considerando que la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria es la “Gold Standard” para evaluar resistencia (Aarestrup, 2004). Aun así, la metodología utilizada en este estudio permite tener una buena aproximación al problema en cuestión, abarcando de manera costo efectiva un gran número de muestras en múltiples predios.

Al analizar los porcentajes de resistencia a cada antimicrobiano mostrados en la Tabla Nro. 2 se revela que existe una gran proporción de cepas resistentes a la amoxicilina. Sin embargo, esto en gran parte podría ser explicado por la resistencia innata que poseen estas bacterias Gram negativas al ser productoras de betalactamasas (Tenover, 2006). Sin embargo, estudios como el de Pereira *et al.*, (2014) revelan igualmente altos grados de resistencia a otros antimicrobianos de esta misma familia que si cuentan con acción contra bacterias Gram negativas.

Se destaca, asimismo, una elevada proporción de resistencia a la oxitetraciclina, esta situación se condice con resultados obtenidos por otros autores a nivel nacional (San Martín *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2013; Hervé *et al.*, 2015). Incluso, en el plano internacional, se reporta una elevada resistencia a las tetraciclinas como el caso de Holanda, Suecia o Estados Unidos (Verdier *et al.*, 2012; Nethmap, 2013; Pereira *et al.*, 2014). La baja sensibilidad de las bacterias a este fármaco puede explicarse por la presión de selección (San Martín *et al.*, 2005), debido a la gran utilización de este antimicrobiano desde hace más de 50 años para distintos tratamientos en el manejo de infecciones de los rebaños bovinos. Sumado a lo anterior, actualmente este fármaco es definido como de importancia crítica para su utilización en medicina veterinaria por la OIE (2015b) dadas sus características de amplio espectro y variadas aplicaciones.

Otro de los antimicrobianos analizados es sulfametoxazol/trimetoprim, el cual también presenta niveles elevados de resistencia. En estudios previos, San Martín *et al.* (2002) evidenció niveles cercanos al 16% advirtiendo que el uso de este antimicrobiano venía en

aumento, lo que en este trabajo se reflejó en un incremento por sobre el doble de resistencia en 15 años. Más aún, otro estudio realizado por Valenzuela *et al.* (2013), en el cual se aislaron cepas patógenas de *E. coli* en necropsias de terneros, se informaron niveles de resistencia cercanos al 67% para este agente antimicrobiano. Solo en el año 2015, el Servicio Agrícola y Ganadero reportó una venta de fármacos de esta familia por sobre los 11.000 Kg. (SAG, 2015), constituyéndose en uno de los grupos de antimicrobianos más vendidos junto con los macrólidos y tetraciclinas.

En relación con el enrofloxacino, identificado en este estudio por parte de los productores como el más utilizado (Tabla Nro. 2), se pueden apreciar niveles más bajos de resistencia que los informados en otros trabajos (Valenzuela *et al.*, 2013; Hervé *et al.*, 2015). Aun así, los niveles reportados se mantienen elevados lo que es de especial preocupación dadas las características de este grupo de antibióticos de generar resistencia cruzada con fármacos de importancia en humanos (San Martín *et al.*, 2005; WHO, 2014).

En cuanto al florfenicol, los niveles de resistencia se han mantenido constantes comparado con los resultados de San Martín *et al.* (2005). Esto a pesar de ser el segundo antimicrobiano más utilizado en terneros según los propios productores. Este resultado se encuentra sobre los reportados por otros investigadores (Pereira *et al.*, 2014; Verdier *et al.*, 2012), los cuales encontraron 12% y 0% de resistencia respectivamente para antimicrobianos de la misma familia, muy por debajo del 25,5% de resistencia detectado en este estudio.

Gentamicina y ceftiofur son los únicos que presentan niveles relativamente bajos de resistencia (7,2% y 18,3% respectivamente), al respecto, los porcentajes de resistencia para estos mismos antimicrobianos difieren entre cada autor. San Martín *et al.* (2005) encontró un 54% de resistencia a ceftiofur en heces de ganado lechero, resultado muy superior a lo reportado en este trabajo, sin embargo, estudios previos informaron niveles cercanos al 7% (San Martín *et al.*, 2002; Borie *et al.*, 2000). En Estados Unidos, Pereira *et al.* (2014) reportó un 100% de sensibilidad a gentamicina, en tanto que un 48% de las cepas fueron resistentes a ceftiofur, Mientras que, en Suecia, Verdier *et al.* (2012) encontró un 100% de sensibilidad a ambos antimicrobianos. Es importante considerar los riesgos que representan para la salud humana un aumento en la resistencia de cefalosporinas de tercera generación como lo es el

ceftiofur, considerada como de importancia crítica en medicina humana por la Organización Mundial de la Salud (Collignon *et al.*, 2009).

No se observó una relación evidente entre los niveles de resistencia reportados y los antimicrobianos disponibles informados por parte de los productores (Tabla Nro. 2), considerando, además, que la mayoría de los terneros nunca habían sido tratados con antimicrobianos. Esto hace presumir que existirían otros factores involucrados en la alta prevalencia de resistencia, tema que será abordado más adelante.

Respecto a las proporciones de resistencia de los distintos grupos, ilustradas en la Figura Nro. 2 y Tabla Nro. 1, se puede apreciar una diferencia significativa en la cantidad de cepas multirresistentes y de extrema resistencia aisladas a partir de los terneros con diarrea, comparado con las muestras provenientes de terneros sanos y de las terneras las cuales presentan una mayor cantidad de resistencia a 1 y 2 antimicrobianos. Si bien algunos de los terneros del grupo con diarrea podrían haber sido expuestos en algún momento a un tratamiento antimicrobiano, los que no se pudieron detectar al momento de la toma de muestra por falta de registros. Esto puede explicar algunos casos de selección de bacterias multirresistentes. Aun así, la gran mayoría de los terneros de este grupo fue detectado con diarrea al momento del muestreo, y los que estaban bajo algún tratamiento antimicrobiano fueron descartados del estudio. La explicación de estas diferencias entre los grupos analizados aún no está del todo clara, sin embargo, existe una teoría que podría explicar este fenómeno. Martínez y Baquero (2002), sugieren que podrían existir genes ligados tanto a factores de virulencia como a resistencia antimicrobiana, por lo que se expresarían de forma conjunta tal como fue demostrado en estudios realizados en cerdos con diarrea (Boerling *et al.*, 2005; Travis *et al.*, 2006). Aun así, se requiere de mayor investigación en torno al tema para dilucidar de manera más precisa esta posible relación.

En relación con los perfiles de resistencia obtenidos, es de especial preocupación la gran cantidad de cepas con características de extrema resistencia (18,9%). Los resultados obtenidos por Verdier *et al.* (2012), arrojaron que un 61% de las cepas aisladas fueron resistentes por lo menos a un antimicrobiano, mientras que un 28% fue resistente a tres o más. En el estudio realizado por San Martín *et al.* (2005), un 86% de las cepas aisladas del

ganado lechero fue resistente por lo menos a un antimicrobiano, un 56% resistencia a tres o más y de estos, un 8% a cinco o más antimicrobianos.

Dentro de los patrones de resistencia identificados, se encontró que de las cepas con perfiles de multirresistencia y extrema resistencia, una de las combinaciones más frecuentes fue la de sulfametoxazol/trimetoprim con oxitetraciclina, asociados generalmente con resistencia a otros antimicrobianos, encontrándose en 123 cepas de las 152 multirresistentes y extremo resistentes (81%). Este hallazgo refuerza la teoría de lo planteado por Khachatryan *et al.* (2004), Khachatryan *et al.* (2006<sup>a</sup>), Khachatryan *et al.* (2006<sup>b</sup>), Khachatryan *et al.* (2008) y Verdier *et al.* (2012), los que señalan que las bacterias con resistencia a sulfonamidas, tetraciclinas y estreptomicina tienen una ventaja selectiva de crecimiento por sobre otras bacterias en el lumen intestinal de terneros menores a 3 meses, esto apoyado por la alimentación que reciben los terneros en este periodo.

### **Factores de riesgo**

En necesario establecer que, debido a la cantidad de predios incluidos en el estudio, y a las variables limitadas que se utilizaron como factores de riesgo, el presente trabajo no pudo establecer en forma exacta cuáles de éstos influyen de forma precisa en los niveles de resistencia. Aun así, entregan una aproximación a la problemática y dan cuenta de que es un problema complejo y multifactorial (Call *et al.*, 2008). De los resultados de resistencia obtenidos, algunos podrían ser atribuibles al uso directo de antimicrobianos, ya que al momento de la recolección de las muestras es probable que algunos terneros hayan estado expuestos a antimicrobianos. Sin embargo, la gran mayoría nunca había estado expuesto directamente a un tratamiento antimicrobiano, lo que hace suponer que existen otros factores asociados a la crianza involucrados en el traspaso de resistencia.

En la presente investigación, ninguno de los factores de riesgo estudiados en la encuesta presentó asociación estadísticamente significativa con los niveles de resistencia. Sin embargo, se obtuvo 5 variables que se consideraron como relevantes a discutir: Estacionalidad, Densidad animal, tipo de ternerera, tipo de alimentador y litros de calostro consumido, las que, a pesar de no ser variables significativas, serán igualmente abordadas por su relevancia biológica y productiva.

En los sistemas con características estacionales, los animales tendieron a presentar menores niveles de resistencia que los sistemas donde hay partos durante todo el año. La razón de esto puede estar dada ya que generalmente en los sistemas estacionales los corrales de los terneros quedan en descanso durante ciertos periodos del año, lo que permite una disminución en la carga bacteriana del medio ambiente, simulando los sistemas “*All in/All out*” utilizados en sistemas de producción de cerdos y aves (Iglesias *et al.*, 2012).

La literatura sugiere que una mayor densidad animal estaría asociada con mayores niveles de resistencia ya que al existir una mayor tasa de contacto entre los animales se facilita la difusión de bacterias comensales y/o patógenas, las cuales pueden ser portadoras de genes de resistencia (Landers *et al.*, 2012). En relación con esto, una tendencia a mayores niveles de resistencia en terneras grupales podría estar explicada por este mismo factor, considerando además que en los sistemas mixtos se tiene a los terneros en corrales individuales durante las primeras semanas de vida, las que son críticas para el establecimiento y difusión de resistencia como se explicará más adelante.

Respecto al tipo de alimentador, en este estudio se encontró que la mayoría de los terneros alimentados automáticamente presentaron niveles bajos de resistencia, sin embargo, en los predios en donde se alimenta con mamaderas grupales se encontraron cantidades similares de alta y baja resistencia, en donde probablemente estén involucrados otros factores. En el estudio realizado por Duse *et al.* (2015), encontraron que alimentar a los terneros con leche proveniente de salas de ordeño o similares tenían un mayor riesgo de resistencia que terneros alimentados con otros sistemas como el automatizado, concluyendo que esta variable necesita de más investigación puesto que existen otros factores que estarían afectando la resistencia.

Los litros de calostro que consumen los terneros fue otra de las variables biológicamente relevantes. De esto, se puede desprender que la importancia de una buena ingesta de calostro en el momento adecuado influye fuertemente en el desarrollo del ternero y principalmente en el desarrollo e inmunidad en el intestino, lo cual le otorga las herramientas para combatir de buena forma infecciones con bacterias patógenas multirresistentes (Blum y Hammon, 2000; Sauter *et al.*, 2004).

Otro de los factores importantes a considerar es la alimentación de los terneros. Lamentablemente no se pudieron obtener datos más completos respecto a la cantidad, frecuencia y cambios en la alimentación dado que ninguno de los productores encuestados manejaba registros precisos. Además, en mucho de los casos, no se tenía certeza del origen de la leche que se le suministraba a los terneros (si era leche fresca o leche de descarte). Por lo que es probable que, una mayor cantidad de los terneros estudiados haya estado expuesto a una dieta con residuos de antimicrobianos. Es por esto que no se puede descartar como un importante factor de riesgo para la introducción de resistencia en los terneros. Varios autores han señalado que la alimentación con leche que contenga residuos de antimicrobianos expone a las bacterias, y sobre todo a *E. coli*, a desarrollar resistencia (Verdier *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Maynou *et al.*, 2017). Más aún, según Duse *et al.* (2015) la alimentación constante con leche con residuos mantendría los altos niveles de resistencia en la flora intestinal de los terneros, incluso contra otros antimicrobianos que no se utilizan en el predio, por lo que se considera que esta es la principal fuente de entrada de resistencia a los terneros.

En este trabajo se pudo comprobar cómo varía la cantidad de resistencia con la edad de los terneros, presentándose un peak de resistencia entre la primera y la segunda semana de vida de los terneros y disminuyendo gradualmente. Esto fue reportado en los trabajos de Call *et al.* (2008), Pereira *et al.* (2014) y Duse *et al.* (2015). La razón de este fenómeno estaría explicada porque los terneros de menor edad no poseen una microflora intestinal desarrollada y diversa como la de un animal maduro, lo que reduce la protección intestinal dando oportunidad a bacterias con un mayor costo de adaptación, tales como bacterias patógenas y/o multirresistentes (Oikonomou *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014).

Como ya fue mencionado, el uso de antimicrobianos en los terneros no es el directo responsable de los altos niveles de resistencia en los terneros. Aun así, la utilización de estos fármacos dentro de cualquier parte de los predios no puede ser ignorada como un factor importante en la generación y difusión de la resistencia, tal como lo indica San Martín *et al.* (2005), quienes compararon sistemas de producción lechera donde la utilización de fármacos es muy frecuente y que presentaban elevados niveles de resistencia, contra sistemas de producción de carne con uso mínimo de antimicrobianos, encontrando niveles de resistencia cercanos al 10%.



Los resultados de resistencia antimicrobiana obtenidos en este estudio dan cuenta de un importante problema, dados los altos niveles de resistencia, encontrados. Es por esto, que se vuelve necesario establecer un programa nacional de control y vigilancia de resistencia integrado, que incluya una regulación en la administración de antimicrobianos.

## **CONCLUSIONES**

Se destaca la baja resistencia que persiste contra gentamicina y ceftiofur, lo que dejaría la opción de tratamientos efectivos contra las infecciones más comunes de los terneros, desde el punto de vista de la resistencia antimicrobiana. Sin embargo, esto debe tenerse en especial cuidado dado el riesgo que existe de generar resistencia contra estos fármacos, limitando aún más las opciones terapéuticas a futuro, además de considerar el contexto clínico al momento de evaluar su utilización. Otro aspecto por resaltar es la gran cantidad de cepas encontradas resistentes a más de 3 antimicrobianos, lo que en concordancia a lo mencionado anteriormente dificulta las opciones para tratar las infecciones.

Respecto de los factores de riesgo asociados a la mantención y difusión de resistencia en los terneros, cabe resaltar que el uso de antimicrobianos en los terneros no parece ser el directo responsable de los altos niveles de resistencia hallados. Adicionalmente, se hace necesario hacer énfasis en la importancia del cuidado de los terneros en las primeras semanas de vida, ya que este periodo sería importante para el establecimiento de las bacterias resistentes, y por lo mismo, un mayor riesgo tanto para la salud humana como animal. Por este motivo, se hace necesario profundizar y tener en consideración este y otros aspectos del manejo de los terneros en futuros trabajos.

## BIBLIOGRAFÍA

**AARESTRUP, F.; BAGER, F.; JENSEN, N.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.** 1998. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS*. 106(8): 745-770.

**AARESTRUP, F.** 2004. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J. Vet. Med.* 51: 380-388.

**ADDIS, Z.; KEBEDE, N.; SISAY, Z.; ALEMAYEHU, H.; WUBETIE, A.; KASSA, T.** 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *salmonella* isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 11:222.

**ANDERSSON, D.; HUGHES, D.** 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol.* 12(7): 465-478.

**BECERRA, G.; PLASCENCIA, A.; LUÉVANOS, A.; DOMÍNGUEZ, M.; HERNÁNDEZ, I.** 2009. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol.* 29(2): 70-76.

**BJÖRN, B.; BÖRJESSON, S.; ENGLUND, S.; ERICSSON, H.; GREKO, C.; GRÖNLUND, U.; LANDÉN, A.; NILSSON, O.; PRINGLE, M.** 2012. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring – SVARM. Editorial Västra Aros. Västerås. Suecia. 64p.

**BLUM, J.; HAMMON, H.** 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livest Prod Sci.* 66(2): 151-159.

**BOERLING, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C.; REID-SMITH, R.; JANECKO, N.; LIM, H.; NICHOLSON, V.; McEWEN, S.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M.** 2005. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol.* 71(11): 6753-6761.

**BORIE, C.; HERNÁNDEZ, P.; SIERRA, G.; SAN MARTÍN, B.** 2000. Patógenos mastitogénicos: etiología bacteriana y monitoreo de resistencia en lecherías de las regiones V y Metropolitana. **In:** XXII Congreso Chileno de Microbiología. Olmué, Chile. 5-7 de Diciembre.

**CALL, D.; DAVIS, M.; SAWANT, A.** 2008. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim Health Res Rev.* 9(2): 159-167.

**CATRY, B.; LAEVENS, H.; DEVRIESE, L.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.** 2003. Antimicrobial resistance in livestock. *J Vet Pharmacol Ther.* 26: 81-93.

**CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2015. About Antimicrobial Resistance. [en línea]. < <http://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>. [Consulta: 15-04-2016].

**CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2015. VET01S Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. CLSI. USA. 128p.

**COLLIGNON, P.; POWERS, J.; CHILLER, T.; AIDARA-KANE, A.; AARESTRUP, F.** 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis.* 49: 132-141.

**DANMAP.** 2013. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. DANMAP. Dinamarca. 108p.

**DARGATZ, D.; FEDORKA-CRAY, P.** 2007. National Antimicrobial Resistance Monitoring System Report. United States Health Association. **In:** Proceedings of the Annual Meeting - United States Animal Health Association. United States Health Association. Minnesota. USA. Pp. 571.

**DECKERT, A.; GOW, S.; ROSENGREN, L.; LEGER, D.; AVERY, B.; DAIGNAULT, D.; IRWIN, R.** 2010. Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (CIPARS) farm program: results from finisher pig surveillance. *Zoonoses Public Health.* 57(s1): 71-84.

**DU, C.; TANG, Y.; KREISWIRTH, B.** 2016. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis.* 16: 287-288.

**DUSE, A.; PERSSON, K.; EMANUELSON, U.; ERICSSON, H.; PERSSON, Y.; BENGTSSON, B.** 2015. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J Dairy Sci.* 98: 500-516.

**ERRECALDE, J.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO. Roma. Italia. 67p.

**GIEDRAITIENE, A.; VITKAUSKIENE, A.; NAGINIENE, R.; PAVILONIS, A.** 2011. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas).* 47(3): 137-146.

**GOTTLIEB, T.; NIMMO, G.** 2011. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at the Antimicrobial Resistance Summit 2011. *Med. J. Aust.* 194(6): 281-283.

**GUERRA, B.; FISCHER, J.; HELMUTH, R.** 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol.* 171: 290-297.

**HAMMERUM, A.; HEUER, O.; EMBORG, H.; BAGGER-SKJOT, L.; JENSEN, V.; ROGUES, A.; SKOV, R.; AGERSÖ, Y.; BRANDT, C.; SEYFARTH, A.; MULLER, A.; HOVGAARD, K.; AJUFO, J.; BAGER, F.; AARESTRUP, F.; FRIMODT-MÖLLER, N.; WEGENER, H.; MONNET, D.** 2007. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1632-1639.

**HERVÉ-CLAUDE, L.; VALENZUELA, B.; PAREDES, E.; MORONI, M.; HAMILTON-WEST, C.; NAVARRETE-TALLONI, M.** 2015. Hallazgos de resistencia a antimicrobianos en aislados de terneros entre los años 2002 a 2015 en la zona sur de Chile. **In:** XII Congreso Chileno de Buiatría. Osorno, Chile. 19-21 de noviembre de 2015.

**IGLESIAS, L.; BARRALES, H.; PRENNA, G.; WILLIAMS, S.** 2012. Diseño y aplicación del manejo en bandas o flujograma. **In:** Castillo, S.; Ruiz, A.; Hernández, J.; Gasa, J. (Eds.). Manual de buenas prácticas de producción porcina. Lineamientos generales para el pequeño y mediano productor de cerdos. Red Porcina Iberoamericana. Pp. 68-77.

**KHACHATRYAN, A.; HANCOCK, D.; BESSER, T.; CALL, D.** 2004. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol.* 70: 752-757.

**KHACHATRYAN, A.; BESSER, T.; HANCOCK, D.; CALL, D.** 2006a. Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. *Appl Environ Microbiol.* 72: 4583-4588.

**KHACHATRYAN, A.; HANCOCK, D.; BESSER, T.; CALL, D.** 2006b. Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 72: 443-448.

**KHACHATRYAN, A.; BESSER, T.; CALL, D.** 2008. The streptomycin-sulfadiazine-tetracycline antimicrobial resistance element of calf-adapted *Escherichia coli* is widely distributed among isolates from Washington state cattle. *Appl Environ Microbiol.* 74: 391-395.

**LABARCA, J.; ARAOS, R.** 2009. Resistencia Antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infect.* 26(supl 1): 8-9.

**LABRO, M.; BRYSKIER, J.** 2014. Antibacterial resistance: an emerging 'zoonosis'?. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 12(12): 1441-1461.

**LANDERS, T.; COHEN, B.; WITTUM, T.; LARSON, E.** 2012. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, Policy, and potential. *Public Health Rep.* 127(1): 4-22.

**MADOFF, L.** 2006. Cooperation between animal and human health sectors is key to the detection, surveillance, and control of emerging disease: IMED 2007 meeting in Vienna, February 2007. *Euro Surveill.* 11(51): 3101.

**MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.; GISKE, C.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.; RICE, L.; STELLING, J.; STRUELENS, M.;**

**VATOPOULOS, A.; WEBER, J.; MONNET, D.** 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18(3): 268-281.

**MARAN.** 2013. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animal in the Netherlands in 2012. [en línea]. <[https://www.wageningenur.nl/upload\\_mm/7/8/9/52388c6c-858c-483c-b57d-227029fe778a\\_005738\\_Nethmap\\_2013%20def\\_web.pdf](https://www.wageningenur.nl/upload_mm/7/8/9/52388c6c-858c-483c-b57d-227029fe778a_005738_Nethmap_2013%20def_web.pdf)>. [Consulta: 22-03-2016].

**MARTINEZ, J.; BAQUERO, F.** 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 15(4): 647-679.

**MATHEW, A.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S.** 2007. Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne Pathog Dis.* 4(2): 115-133.

**McEWEN, S.; FEDORKA-CRAY, P.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* 34(Suppl 3): S93-S106.

**MELLA, A.; HUENUL, D.; COLLADO, L.; MONTI, G.; ULLOA, F.; KRUZE, J.** 2013. Cepas de *Staphylococcus* Meticilina resistente aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis. In: XI Congreso Chileno de Buiatría. Osorno, Chile. 21-23 noviembre de 2013.

**MINSAL.** 2017. Plan nacional contra la resistencia a los antimicrobianos. [en línea]. <<http://web.minsal.cl/plan-nacional-contrala-resistencia-a-los-antimicrobianos/>>. [Consulta: 15-11-2017].

**MORENO, M.; DOMÍNGUEZ, L.; TESHAGER, T.; HERRERO, I.; PORRERO, M.C.** 2000. Antibiotic resistance monitoring: The Spanish programme. *Int J Antimicrob Agents.* 14: 285-290.

**NETHMAP.** 2013. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. SWAB. Netherlands. 126 p.

**NORM/NORM-VET.** 2013. Report on Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway in animals and humans. [en línea]. <<http://www.vetinst.no/eng/Publications/NORM-NORM-VET-Report/NORM-NORM-VET-2013>>. [Consulta: 22-03-2016].

**ODEPA.** 2016. Boletín de la Leche: producción, recepción, precios y comercio exterior. [en línea]. <[http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2016/03/informe\\_lacteo\\_012016.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2016/03/informe_lacteo_012016.pdf)>. [Consulta: 20-03-2016].

**OIKONOMOU, G.; VIEIRA, A.; FODITSCH, C.; BICALHO, M.; SILVA, V.; CARVALHO, R.** 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S Rdna. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. *PLoS ONE.* 8(4): e03157.

**OIE ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2015a. Título 7: Bienestar de los animales. **In:** Código sanitario para los animales terrestres. 24<sup>a</sup> Edición. Organización mundial de sanidad animal. París. Francia.

**OIE ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2015b. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. [en línea]. <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/Sp\\_OIE\\_List\\_antimicrobials\\_Mayo2015.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Sp_OIE_List_antimicrobials_Mayo2015.pdf)>. [Consulta: 10-04-2017].

**PEREIRA, R.; SILER, J.; CARVALHO, R.; WARNICK, L.** 2014. In vivo selection of resistant *E. Coli* after ingestion of milk with added drug residues. PLoS ONE. 9(12): e115223.

**SAG SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2015. Declaración de ventas antimicrobianos. [en línea]. < <http://www.sag.cl/content/declaracion-de-venta-de-antimicrobianos-2015>>. [Consulta: 11-03-2017].

**SAG SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2016. Medicamentos de uso veterinario. [en línea]. < <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/medicamentos-de-uso-veterinario>>. [Consulta: 11-05-2016].

**SAN MARTÍN, B.; CAÑÓN, H.** 2000. Resistencia bacteriana: Un problema mundial en medicina veterinaria y humana. [en línea]. < <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/5014/4898>>. [Consulta: 11-05-2016].

**SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. Arch Med Vet. 34(2): 221-234.

**SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; IRAGÜEN, D.; ESPINOZA, S.; LEÓN, B.; BORIE, C.** 2003. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from dairy herds in Chile. J Appl Res Vet Med. Vol. 1.

**SAN MARTÍN, B.; BRAVO, V.; BORIE, C.** 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. Arch Med Vet. 37(2): 117-123.

**SAUTER, S.; ROFFLER, B.; PHILIPONA, C.; MOREL, C.; ROMÉ, V.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.; HAMMON, H.** 2004. Intestinal Development in neonatal Calves: Effects of Glucocorticoids and Dependence on Colostrum Feeding. Biol Neonate. 85: 94-104.

**SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N.** 2005. Genus I. Escherichia. **In:** Brenner, D. Krieg, N.; Staley, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>a</sup> ed. Springer. Michigan. USA. Vol. 2. P 607-624.

**SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res. 32: 201-225.

- SMITH, R.; COAST, J.** 2002. Antimicrobial resistance: a global response. Bulletin of the world health organization. 80: 126-133.
- SOULSBY, L.** 2007. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. J. Antimicrob. Chemother. 60(5):1184.
- TENOVER, F.** 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. Am J Med. 119 (6): 3-10.
- TRAVIS, R.; GYLES, C.; REID-SMITH, R.; POPPE, C.; McEWEN, S.; FRIENDSHIP, R.; JANECKO, N.; BOERLIN, P.** 2006. Chloranphenicol and kanamycin resistance among porcine Escherichia coli in Ontario. J Antimicrob Chemother. 58: 173-177.
- VALENZUELA, B.; MORONI, M.; PAREDES, E.; NAVARRETE, M.** 2013. Causas de muerte de terneros neonatos en el sur de Chile y Resistencia bacteriana: Período 2002-2012. In: XI Congreso Chileno de Buiatría. Osorno, Chile. 21-23 de noviembre de 2013.
- VAN DEN BOGAARD, A.; STOBBERINGH, E.** 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents. 14: 327-335.
- VERDIER, K.; NYMAN, A.; GREKO, C.; BJÖRN, B.** 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in Escherichia coli from Swedish dairy calves. Acta Vet Scand. 54:2.
- WHO. World Health Organization** 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO. Ginebra. Suiza. 256p.
- WITTE, W.** 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. Int J Antimicrob Agents. 16: s19-s24.



## Anexos

### Anexo 1. Consentimiento informado

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, ....., Declaro haber sido informado de todo el proceso de toma de muestras y de la utilización de estas con fines de investigación, asimismo, consiento participar del proyecto "Unveiling the antimicrobial resistance in dairy farms in southern Chile: Resistance patterns and associated risk factors in E. coli, Salmonella sp." A cargo del Dr. Luis Pablo Hervé.

---

Nombre, Rut y firma

---

**Anexo 2.** Ficha de registro individual

Ficha de registro individual							
N° Muestra	N° Crotal	Grupo (S/D/A)	Edad	Sexo	Raza		
1							<b>Simbología:</b>
2							S= Sano
3							D= Diarrea
4							A= Ambiental
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

### Anexo 3: Certificado de bioética para la toma de muestras



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Comité de Bioética Animal

Santiago, 24 de junio de 2014

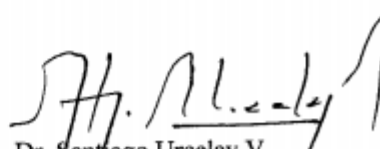
#### CERTIFICADO N° 17-2014

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Unveiling the antimicrobial resistance in dairy farms in southern Chile: Resistance patterns and associated risk factors in *E. coli*, *Salmonella* sp.”**, presentado al concurso U-Inicia-2014, donde el Investigador Responsable será el **Dr. Luis Pablo Hervé C.**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable cuenta con el consentimiento de los propietarios de los animales para la toma de muestras. Además se compromete a no modificar la metodología señalada en el proyecto sin antes reenviar el formulario para la obtención de un certificado de Bioética.

  
Dra. Tamara Tadich G.  
Director  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay V.  
Presidente  
Comité de Bioética Animal

## Anexo 4. Encuesta aplicada a productores lecheros

Fecha											N°		
<b>Encuesta epidemiológica - Uso de Antimicrobianos</b>													
<b>1. Información Predial</b>													
1.1. Encuestado											1.2. Nom. Predio		
1.3. GIS											1.4. RUP		
1.5. Superficie			ha.	1.6 Vacas en leche					1.7 Terneros				
				1.8 Total bovinos									
<b>2. Infraestructura</b>													
2.1. Tipo terneras	2.1.1. Grupales		<input type="checkbox"/>	a) No. Galp.			b) N° Grupos						
				c) T. x Grupo			d) Tamaño						
				2.1.2. Individuales	<input type="checkbox"/>		a) No. Galp.			b) Número			
				c) Tamaño									
2.2. Materialidad ternera	2.2.1. madera		<input type="checkbox"/>	2.3. Aseo terneras				Diario					
				2.2.2. Plastico				Semanal					
				2.2.3. Metal				Mensual					
								Fin del ciclo					
2.4. Camas	Paja		<input type="checkbox"/>	2.5. Recambio cama				Diario					
				Arena				Día x medio					
				Sintética				Semanal					
2.6. Piso terneras	Tierra		<input type="checkbox"/>					Mensual					
				Radier				Fin del ciclo					
				Madera									
				Otro									
<b>3. Manejos prediales</b>													
3.1. Estacionalidad de partos	No	<input type="checkbox"/>	Si	<input type="checkbox"/>	Veces al año								
3.2. Sexo de terneros	Solo hembras		<input type="checkbox"/>	Machos y hembras									
3.3. Calostro	Días suministro				Tipo calostro		Pool Fresco						
						Pool Congelado							
						De la madre							
3.4. Alimento terneros	Sustituto		H	M	Tipo alimentador								
				Leche descarte									
				Leche fresca									
				Acidificada									
						3.5 Vacunaciones		Tipo					
								Tipo					
								Tipo					
<b>4. Uso de AM</b>													
4.1. Terneros		AM Disponible				AM Disponible							
		Indicación				Indicación							
		Uso				Uso							

**Anexo 5.** Interpretación batería bioquímica para identificación de *E. coli*.

<b>Compuesto</b>	<b>Interpretación</b>
TSI (Agar Hierro Triple Azúcar)	Fermentador de azúcares (+) (columna y extendido amarillo), producción de gas en el agar (+), producción ácido sulfhídrico (-) (no hay ennegrecimiento del medio).
LIA (Lisina Hierro Agar)	Descarboxilación de lisina (+) (Columna y extendido púrpura), producción ácido sulfhídrico (-) (no hay ennegrecimiento del medio).
MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)	Motilidad (+), indol (+) (anillo rojo al agregar reactivo de Kovac's), Ornitina (+/-) (medio amarillo o púrpura).
Citrato-Simmons	Prueba negativa, el medio debe permanecer de color verde.
Agar Urea	Negativo, el medio debe permanecer de color amarillo

**Anexo 6.** Abreviación, concentración y rangos de interpretación de los antimicrobianos utilizados.

<b>Abreviación</b>	<b>Antimicrobiano</b>	<b>Concentración (Mcg)</b>	<b>Sensible (≥ mm)</b>	<b>Resistente (≤ mm)</b>
AMX	Amoxicilina	10	22	21
CEF	Ceftiofur	30	21	20
ENR	Enrofloxacino	5	23	22
FLO	Florfenicol	30	22	21
GEN	Gentamicina	10	16	15
OXT	Oxitetraciclina	30	16	15
SXT	Sulfametoxazol- trimetoprim	25	16	15

**Anexo 7:** Resultados de encuesta aplicada a los productores para la caracterización de algunos manejos en los terneros en 20 lecherías de la zona sur de Chile.

<b>Variable</b>	<b>Categoría</b>	<b>Valor</b>	<b>%</b>
<b>Estacionalidad<sup>1</sup></b>	Si	15	75
	No	5	25
<b>Alimentación</b>	Descarte	1	5
	Sustituto	7	35
	Leche	3	15
	Mezcla <sup>2</sup>	9	45
<b>Aseo ternereras</b>	Frecuente	13	65
	Infrecuente	7	35
<b>Cantidad de calostro</b>	Poco	2	10
	Medio	4	20
	Mucho	2	10
	Ad libitum	12	60
<b>Material ternereras</b>	Metal	3	15
	Madera	17	85
<b>Origen calostro</b>	Pool Fresco	8	42
	Madre	11	58
<b>Recambio Cama</b>	Frecuente	7	35
	Infrecuente	13	65
<b>Tipo alimentador</b>	Automático	5	25
	Mamaderas Grupales	15	75
<b>Tipo suelo</b>	Madera	1	5
	Tierra	11	55
	Radier	8	40
<b>Tipo ternerera</b>	Grupales	13	65
	Grupales + Individuales	7	35

<sup>1</sup> Esta variable implica si se realizaba algún tipo de manejo en las vacas para concentrar los partos en 2 o más temporadas.

<sup>2</sup> Las mezclas eran formuladas principalmente con leche de descarte junto con leche fresca, acidificada o sustituto.