

ORIGINAL

Antimicrobial resistance in *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates from calves in southern Chile

Resistencia a antimicrobianos en *E. coli* y *Salmonella* spp. de terneros del sur de Chile

Luis Hervé-Claude¹ Ph.D, Bárbara Valenzuela H² DVM, Enrique Paredes H² Dr. med.vet, Manuel Moroni R² M.Sc, María Navarrete-Talloni^{2*} Ph.D.

¹Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Ciencias Clínicas, Unidad de Medicina Productiva de Rumiantes., Av. Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile. ²Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Patología Animal, Laboratorio de Anatomía Patológica Veterinaria, Edificio Federico Saelzer, 3^{er} Piso, Isla Teja, Valdivia, Chile. *Correspondence: majose.navarrete@uach.cl

Received: November 2016; Accepted: March 2017.

ABSTRACT

Objective: Description of antimicrobial resistance in *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates from calves <30 days of age from southern Chile. **Material and methods:** Necropsy and microbiology reports of 107 calves <30 days of age received at the Animal Pathology Institute between 2002 and 2015 were considered. Additionally, an antimicrobial resistance score was generated to allow comparisons among isolates with different antimicrobial susceptibility profiles. **Results:** There was no clear trend in antimicrobial resistance during the study period, with similar levels of resistance for *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. Approximately 50% of isolates were sensitive to antimicrobials, and between 19 and 36% of samples showed possible extended- or pan- drug resistance. Multiple different antimicrobial resistance patterns were found, including 32 for *E. coli*, 17 for β -hemolytic *E. coli* and 10 for *Salmonella* spp. **Conclusions:** Overall, *E. coli* samples were most sensitive to ceftriaxone; β -hemolytic *E. coli* to florfenicol; and *Salmonella* spp. to gentamicin. In contrast, these agents were resistant to amoxicillin, ampicillin and oxytetracycline respectively. This study is unique in its approach and provides useful information for veterinarians and producers on the antibiotic resistance patterns of bacteria posing a serious threat to calves. These results can help field veterinarians to control and treat bacterial diarrhea in calves.

Keywords: Dairy, Beef cattle, Antimicrobial agents, Treatment (Source: MeSH & CAB).

RESUMEN

Objetivo: Describir los hallazgos de resistencia a antimicrobianos en aislados de *Salmonella* spp. y *E. coli* obtenidos de terneros de menos de 30 días de edad en el sur de Chile. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron reportes de necropsia y microbiología de 107 terneros en el período comprendido entre 2002 y 2015. Adicionalmente se generó un Score de Resistencia a antimicrobianos para permitir la comparación entre aislados que fueron evaluados contra un set de distintos antimicrobianos. **Resultados:** No se observa una clara tendencia en la resistencia en el período en estudio, con similares niveles de resistencia observados para *E. coli*, *E. coli* β -hemolítica y *Salmonella* spp. Aproximadamente 50% de los aislados mostraron amplia sensibilidad a antimicrobianos, y entre 19 y 36% de los aislados demostraron potencial de resistencia extendida y pan resistencia respectivamente. Se encontraron múltiples patrones de resistencia, incluyendo 32 para *E. coli*, 17 para *E. coli* β -hemolítica y 10 para *Salmonella* spp. **Conclusiones:** En general, *E. coli* se mostró más sensible a ceftriaxona, *E. coli*

β -hemolítica a Florfenicol y *Salmonella* spp. a gentamicina. En contraste, estos agentes fueron resistentes a amoxicilina, ampicilina y oxitetraciclina respectivamente. Este estudio es único en su aproximación y provee de información útil para médicos veterinarios y productores sobre los patrones de resistencia que amenazan la salud de los terneros. Estos resultados pueden ayudar a médicos veterinarios de campo a enfrentar y controlar efectivamente las diarreas en terneros.

Palabras clave: Lechería, agente antimicrobiano, tratamiento (Fuente: MeSH y CAB).

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a serious threat to global public health (1) because antimicrobial use is an important factor in maintaining human and animal health worldwide (2). Antimicrobial-resistant populations are present in all bacterial communities (3), thus representing a serious threat to both human and animal populations, especially considering the potential transfer of resistance and zoonotic diseases via the food chain to humans (2,4). The main causes of antimicrobial resistance in food animals seem mainly to be excessive use of antimicrobials, incorrect antimicrobial dosage and unregulated access to drugs (5). Therefore, and considering that antimicrobial agents are the most important therapeutic tool against bacterial diseases in both human and animals (5,6), it is of the upmost relevance to avoid development of antimicrobial resistance in bacteria to ensure therapeutic efficacy. Therefore, prudent use of antimicrobials is necessary (7) combined with overall coordination of medication, governmental regulation and surveillance (5).

Few studies have been done in Chile regarding antimicrobial resistance in cattle – most antimicrobial resistance studies in Chile have been performed in animals such as poultry and swine (8,9). Previous work in dairy farms and cattle – performed more than two decades ago – focused on subclinical and clinical mastitis in both central and southern Chile followed by work on mastitis and antimicrobial resistance (10,11). Additional research concentrated mainly on cattle in the central region looking at *Escherichia coli* from fecal samples in dairy and beef cattle (12). Globally, some studies have described antimicrobial resistance trends for *E. coli* in multiple species including calves (13,14), although work tends to focus on specific genetic characterization of isolates (8,15). These studies of antimicrobial resistance often have shown resistance patterns that are highly variable among and within farms.

Antimicrobial resistance monitoring programs have been established in several countries, like the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program (DANMAP) (16) or the United States of America National

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es una grave amenaza para la salud pública mundial (1) ya que el uso de antimicrobianos es un factor importante en el mantenimiento de la salud humana y animal en todo el mundo (2). Las poblaciones resistentes a los antimicrobianos están presentes en todas las comunidades bacterianas (3), lo que representa una grave amenaza para las poblaciones humanas y animales, especialmente teniendo en cuenta la posible transferencia de resistencias y enfermedades zoonóticas a los humanos a través de la cadena alimentaria (2,4). Las principales causas de la resistencia a los antimicrobianos en los animales destinados a la alimentación parecen ser principalmente el uso excesivo de antimicrobianos, dosis antimicrobianas incorrectas y el acceso no regulado a los medicamentos (5). Por lo tanto, y considerando que los agentes antimicrobianos son la herramienta terapéutica más importante contra las enfermedades bacterianas tanto en humanos como en animales (5,6), es de vital importancia para evitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana para asegurar la eficacia terapéutica. Por lo tanto, es necesario el uso adecuado de antimicrobianos (7) combinado con la coordinación general de medicamentos, la regulación gubernamental y la vigilancia (5).

Se han realizado pocos estudios en Chile relacionados con la resistencia a los antimicrobianos en el ganado bovino. La mayoría de los estudios de resistencia a los antimicrobianos en Chile se han realizado en animales como aves de corral y cerdos (8,9). Trabajos anteriores incluyen granjas lecheras y con ganado vacuno, realizados hace más de dos décadas, se centraron en mastitis subclínica y clínica en el centro y el sur de Chile seguidos de trabajos sobre mastitis y resistencia a los antimicrobianos (10,11). La investigación adicional se concentró principalmente en el ganado de la región central que evalúa la *Escherichia coli* a partir de muestras fecales en ganado lechero y de carne (12). A nivel mundial, algunos estudios han descrito las tendencias a la resistencia a los antimicrobianos para *E. coli* en múltiples especies, incluyendo terneros (13, 14), aunque este trabajo tiende a centrarse en la caracterización genética específica de

Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (6) among others. Chile recently started its "National Antimicrobial Resistance Control Plan". It is officially required a prescription for purchasing antimicrobials. Even though it is mandatory, the authors have observed that it is a common practice to sell antimicrobials without prescription.

In some developing countries, it is believed that the unrestricted use of antimicrobials could be producing widespread resistance (17), although little information is available. Some antimicrobials are being described by clinicians as useless for control of diarrhea and pneumonia in calves or mastitis in dairy cows. This could be explained by incorrect diagnosis, inappropriate treatment (e.g., dosage) or to antimicrobial resistance.

This study, based on historical records from a university reference diagnostic laboratory, aims to identify phenotypic antimicrobial resistance findings in calves, in association to antimicrobial use, antimicrobial resistance patterns and practical association to the effectiveness of antimicrobials in the field.

MATERIALS AND METHODS

Study location. Information was collected from necropsy records from 2002 through 2015 from the Veterinary Anatomic Pathology Laboratory at Universidad Austral de Chile. (In the years 2008 and 2009 no antimicrobial resistance evaluations were done due to lack of infrastructure after a fire destroyed the microbiology laboratories). This Laboratory is located in the Los Ríos region in southern Chile, in the city of Valdivia. The coordinates are: latitude -39.804437, longitude -73.252787 and altitude 5 m.

Records. Records of all calves <30 days old with antimicrobial resistance test performed on bacterial isolates were selected for study. Information collected included animal information like sex, age, breed and production use (beef or dairy). Basic farm information included owner name, address, commune and region. Temporal information like date of reception of the animal/sample, date of necropsy and antimicrobial resistance results was also retrieved from the records.

Data analysis. Based on the evaluation of 17 commonly used antimicrobials, isolates were classified as either resistant (including non-conclusive results) or sensitive to antimicrobials. Each isolate was tested for a variety of antimicrobials, ranging from four to eleven (Table 1). When receiving the sample, the laboratory

los aislamientos (8, 15). Estos estudios de resistencia a los antimicrobianos a menudo han mostrado patrones de resistencia muy variables entre y dentro de las granjas.

Se han establecido programas de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos en varios países, como el Programa Danés de Monitoreo e Investigación de la Resistencia a los Antimicrobianos (DANMAP) (16) o el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia a los Antimicrobianos (NARMS) (6), entre otros. Chile recientemente comenzó el "Plan Nacional contra la resistencia a los antimicrobianos". Se requiere de una prescripción médica para la compra de estos fármacos. A pesar de que es obligatorio, los autores han observado que es una práctica común vender antimicrobianos sin prescripción médica.

En algunos países en desarrollo, se cree que el uso irrestricto de antimicrobianos podría estar produciendo una resistencia generalizada (17), aunque hay poca información disponible. Algunos antimicrobianos están siendo descritos por los médicos como inútiles para el control de diarrea y neumonía en terneros o mastitis en vacas lecheras. Esto podría explicarse mediante diagnósticos incorrectos, tratamientos inapropiados (por ejemplo, dosificación) o resistencia a los antimicrobianos.

Este estudio, basado en registros históricos de un laboratorio universitario de diagnóstico de referencia, tiene como objetivo identificar los hallazgos fenotípicos de la resistencia a los antimicrobianos en terneros, en asociación con el uso de antimicrobianos, patrones de resistencia a los antimicrobianos y la asociación práctica a la efectividad de antimicrobianos en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. Se recolectó información de los registros de necropsia entre 2002 y 2015 del Laboratorio de Anatomía Patológica de Anatomía Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. (En los años 2008 y 2009 no se realizaron evaluaciones de resistencia a antimicrobianos debido a la falta de infraestructura después de que un incendio destruyó los laboratorios de microbiología). Este laboratorio está ubicado en la región de Los Ríos en el sur de Chile, en la ciudad de Valdivia. Las coordenadas son: latitud -39.804437, longitud -73.252787 y altitud 5 m.

Registros. Se seleccionaron para estudio los registros de todos los terneros <30 días de edad con prueba de resistencia a antimicrobianos realizada en aislamientos bacterianos. La

Table 1. Antimicrobial resistance score (AMR score*) from isolates obtained from <30-day-old calves between 2002 and 2015 in southern Chile.

Isolate	AMR score				
	No.	Average	S.D.	Min	Max
<i>E. coli</i>	61	1.75	0.5	1	2.7
β -hemolytic <i>E. coli</i>	27	1.67	0.5	1	3.0
<i>Salmonella</i> spp.	19	1.72	0.6	1	2.5

* An isolate identified as sensitive to an antimicrobial was assigned a score of "1". A non-conclusive or a resistant isolate received an AMR score of "3". AMR scores were added and averaged per sample. If the final averaged score was 1, the sample was considered "fully sensitive" and if the score was >1, the sample was considered "resistant". An AMR score of "3" means resistance to all antimicrobials tested.

collected information on whether the submitted animal had been treated with antimicrobials (type & dose not specified). Overall results were recorded in an MS Excel® database. Isolates considered in this study include only *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. Most calves were submitted after serious negative health events occurred, associated mortalities, diarrhea and respiratory disease events in calf pens (data not shown).

Classical microbiology procedures were followed for the isolation and identification of *E. coli* and *Salmonella* spp. from either feces or tissue smears, using CLSI standard procedures (18). All isolates were tested against a different set of antimicrobials using disc diffusion method (18). The set of antimicrobials to be tested depended on recommendations from the field veterinarian, pathologist or the laboratory personnel, and therefore there was large variation in the number of antimicrobials tested on each isolate, ranging from four to eleven. Overall 17 different antimicrobials were tested: gentamicin, ampicillin, amoxicillin, cefacetril, cefapirin, cefuroxime, cefoperazone, ceftiofur, ceftriaxone, ceftiofur, florfenicol, danofloxacin, enrofloxacin, nalidixic acid, doxycycline, oxytetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole.

Antimicrobial resistance score. Basic data description was performed on the antimicrobial resistance cases identified. Antimicrobial resistance was described for each isolate species, in association with the number of reported antimicrobials used and per year throughout the study period. Antimicrobial resistance findings were coded into a score (antimicrobial resistance score = AMR score), to aggregate all the available resistance information (*E. coli* and *Salmonella* spp. isolates, antimicrobials, years, etc.) to identify overall resistance pattern. An isolate identified as sensitive to an antimicrobial was

información recolectada incluyó información sobre los animales como el sexo, la edad, la raza y el uso de la producción (carne de res o lácteos). La información básica de la granja incluyó el nombre del propietario, dirección, a comuna y región. La información temporal como la fecha de recepción del animal / muestra, la fecha de necropsia y los resultados de la resistencia a antimicrobianos también se obtuvieron de los registros.

Análisis de los datos. Con base en la evaluación de 17 antimicrobianos de uso común, los aislamientos se clasificaron como resistentes (incluidos los resultados no concluyentes) o sensibles a los antimicrobianos. Cada aislamiento se probó para una variedad de antimicrobianos, que varían de cuatro a once (Tabla 1). Al recibir la muestra, el laboratorio recolectó información sobre si el animal presentado había sido tratado con antimicrobianos (tipo y dosis no especificados). Los resultados generales se registraron en una base de datos MS Excel ©. Los aislamientos considerados en este estudio incluyen solo *E. coli*, *E. coli* β -hemolítica y *Salmonella* spp. La mayoría de los terneros se presentaron después de que ocurrieron eventos de salud negativos graves, mortalidades asociadas, diarrea y eventos de enfermedad respiratoria en terneras (datos no presentados).

Se siguieron procedimientos de microbiología clásica para el aislamiento e identificación de *E. coli* y *Salmonella* spp. a partir de heces o frotis de tejidos, utilizando los procedimientos estándar de CLSI (18). Todos los aislamientos se probaron contra un conjunto diferente de antimicrobianos utilizando el método de difusión de disco (18). El conjunto de antimicrobianos que se probaron dependía de las recomendaciones del veterinario de campo, el patólogo o el personal del laboratorio, y, por lo tanto, hubo una gran variación en el número de antimicrobianos probados en cada aislamiento, oscilando entre cuatro y once. En general se probaron 17 antimicrobianos diferentes: gentamicina, ampicilina, amoxicilina, cefacetril, cefapirina, cefuroxima, cefoperazona, ceftiofur, ceftriaxona, ceftiofur, florfenicol, danofloxacina, enrofloxacina, ácido nalidixico, doxiciclina, oxitetraciclina y trimetoprima / sulfametoxazol.

Puntaje de resistencia a los antimicrobianos. Se realizó una descripción de los datos básicos sobre los casos de resistencia a los antimicrobianos identificados. Se describió la resistencia a los antimicrobianos para cada especie aislada, en asociación con el número de antimicrobianos informados utilizados y por año durante todo el

assigned a score of "1". A non-conclusive or a resistant isolate received an AMR score of "3". AMR scores were added and averaged per sample.

- If the final averaged score was 1, the sample was considered "fully sensitive"

- If the score was >1, the sample was considered "resistant". With the aggregated data that included information on all bacterial species isolated and antimicrobials tested, an overall resistance pattern was constructed.

Additionally, and based on the antimicrobial resistance classifications published by Magiorakos (19), all isolates were classified in either "Sensitive" (low or no resistance found), MDR - multi drug resistant: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories, Possible XDR (extensively drug resistant): non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≥ 2 categories and Possible PDR (pan drug resistant): non-susceptible to all antimicrobial agents listed. Further comparisons for AMR patterns were performed using classic statistical methods for non-normally distributed data, like the Kruskal-Wallis test ($p=0.05$).

RESULTS

Overall 107 antimicrobial resistance evaluations were included in this study. Most animals originated in the Los Ríos and neighboring regions: 55 (51%) Los Ríos, 43 (40%) Los Lagos. Nine calves (8%) came from the Araucanía, Bío-Bío and unrecorded regions. All these regions are in central southern Chile, roughly between 36-43° South and 74-72° West. Also, 93 (87%) samples were from dairy calves and 15 (14%) from beef or dual production calves. The main breed reported was *Frisón Negro* (53 animals, 50%) followed by 30 (28%) Holstein-Friesian animals. Other reported breeds (26%) included local breeds like *Overo Colorado*, Angus and Wagyu calves. Reported sex of the animals was 53 (50%) males and 45 (42%) females, with 11 (10%) missing values. Fifty percent of the calves included in this study were <10 days old and 50% between 10 and 29 days old.

Of the collected samples, 29 (27%) came from animals already treated with antimicrobials, 36 (34%) samples were from untreated calves and 44 (41%) of records did not contain this information. Sixty-one of the isolates were *E. coli*, 27 were β -hemolytic *E. coli* and 19 *Salmonella* spp. The antimicrobial resistance score (AMR) was calculated for each of the isolates. This allowed statistical description of overall antimicrobial resistance patterns for *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. (Table 1). AMR scores were similar among the 3 bacterial groups, with no statistically significant differences found among groups (Kruskal-Wallis, $p=0.79$).

período de estudio. Los hallazgos de resistencia antimicrobiana se codificaron en una puntuación (puntaje de resistencia antimicrobiana = puntaje de AMR), para agregar toda la información de resistencia disponible (aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* spp., Antimicrobianos, años, etc.) para identificar el patrón de resistencia general. A un aislado identificado como sensible a un antimicrobiano se le asignó una puntuación de "1". Un aislamiento no concluyente o resistente recibió una puntuación de AMR de "3". Los puntajes de AMR se agregaron y promediaron por muestra.

- Si el puntaje promediado final fue 1, la muestra se consideró "totalmente sensible"

- Si el puntaje fue > 1, la muestra se consideró "resistente". Con los datos agregados que incluían información sobre todas las especies bacterianas aisladas y antimicrobianos analizados, se construyó un patrón de resistencia global.

Adicionalmente, y con base en las clasificaciones de resistencia antimicrobiana publicadas por Magiorakos (19), todos los aislamientos se clasificaron como "Sensible" (resistencia baja o nula), MDR - resistente a múltiples fármacos: no susceptible a ≥ 1 agente en ≥ 3 antimicrobianos categorías, posible XDR (extensamente resistente a los medicamentos): no susceptible a ≥ 1 agente en todas las categorías, excepto ≥ 2 y posible PDR (pan resistente a los medicamentos): no susceptible a todos los agentes antimicrobianos enumerados. Se realizaron comparaciones adicionales para los patrones de AMR utilizando métodos estadísticos clásicos para datos no distribuidos normalmente, como la prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$).

RESULTADOS

En total se incluyeron 107 evaluaciones de resistencia a los antimicrobianos en este estudio. La mayoría de los animales provenían de Los Ríos y regiones vecinas: 55 (51%) de Los Ríos, 43 (40%) de Los Lagos. Nueve terneros (8%) provenían de la Araucanía, Bío-Bío y regiones no registradas. Todas estas regiones se encuentran en el centro sur de Chile, aproximadamente entre 36-43 ° sur y 74-72 ° oeste. Además, 93 (87%) muestras fueron de terneros lecheros y 15 (14%) de terneros de carne o de doble propósito. La raza principal reportada fue Frisón Negro (53 animales, 50%) seguido de 30 (28%) animales Holstein-Friesian. Otras razas reportadas (26%) incluyen razas locales como los terneros Overo Colorado, Angus y Wagyu. El sexo reportado de los animales fue de 53 (50%) machos y 45 (42%) hembras, con 11 (10%) de valores perdidos. El cincuenta por ciento de los terneros incluidos

The yearly overall antimicrobial resistance data can be observed in figure 1. When observing the changes in AMR score in relation in calve age, it was seen that the averages score remains practically the same, with no greater resistance found in older calves and no statistical differences among age groups (Kruskal-Wallis test, $p=0.97$; data not shown). Isolates were classified as "sensitive" and "multi resistant" (MDR + possible XDR + possible PDR) (Figure 2) and a more detailed classification in "sensitive", "MDR", "possible XDR" and "possible PDR" can be observed in table 2. AMR scores for antimicrobials tested 10 or more times are listed in table 3. *E. coli* was highly susceptible to ceftriaxone (AMR score = 1.0) and ceftiofur & cefoperazone (AMR score = 1.1); β -hemolytic *E. coli* to florfenicol, ceftiofur and gentamicin (AMR score = 1.4); and *Salmonella* spp. to gentamicin (AMR score = 1.0).

From all isolates studied, the antimicrobial resistance pattern was summarized in table 4. The most common multidrug resistance phenotype observed in *E. coli* was amoxicillin, cefuroxime, florfenicol, enrofloxacin, oxytetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole (in 5 isolates); for β -hemolytic *E. coli* this phenotype was oxytetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole (in 4 isolates); and for *Salmonella* spp. it was florfenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole and amoxicillin, cefuroxime

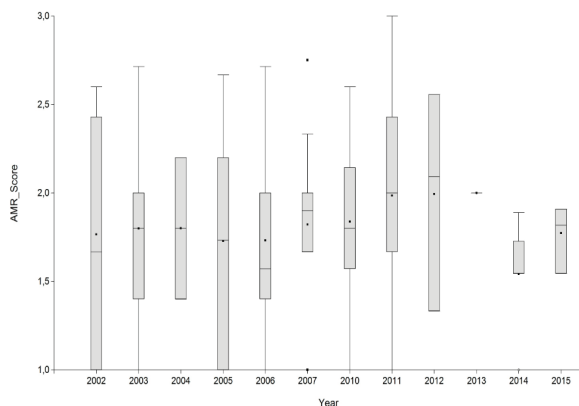


Figure 1. Overall antimicrobial resistance score (AMR score) from *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates obtained from up <30 day old calves between 2002 and 2015. *No data available for 2008 and 2009. An isolate identified as sensitive to an antimicrobial was assigned a score of "1". A non-conclusive or a resistant isolate received an AMR score of "3". AMR scores were added and averaged per sample. If the final averaged score was 1, the sample was considered "fully sensitive" and if the score was >1, the sample was considered "resistant". Boxes represent data within the 0.25 and 0.75 quantiles. Whiskers, the 0.05 and 0.95 quantiles.

en este estudio tenían <10 días y el 50% tenían entre 10 y 29 días de edad.

De las muestras recolectadas, 29 (27%) procedían de animales que ya habían sido tratados con antimicrobianos, 36 (34%) muestras provenían de terneros no tratados y 44 (41%) de los registros no contenían esta información. Sesenta y uno de los aislamientos fueron *E. coli*, 27 fueron *E. coli* β -hemolíticos y 19 *Salmonella* spp. La puntuación de resistencia antimicrobiana (AMR) se calculó para cada uno de los aislados. Esto permitió una descripción estadística de los patrones generales de resistencia a los antimicrobianos para *E. coli*, *E. coli* β -hemolítica y *Salmonella* spp. (Tabla 1). Las puntuaciones de AMR fueron similares entre los 3 grupos bacterianos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis, $p=0.79$).

Los datos anuales de resistencia a los antimicrobianos se pueden observar en la figura 1. Al observar los cambios en la puntuación AMR en relación a la edad del ternero, se observó que el puntaje promedio permanece prácticamente igual, sin mayor resistencia encontrada en terneros mayores y sin diferencias estadísticas entre los grupos de edad (prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.97$; datos no mostrados). Los aislamientos se clasificaron como "sensibles" y "multirresistentes" (MDR + posible XDR + PDR posible) (Figura 2) y una clasificación más detallada en "sensible", "MDR", "posible XDR" y "posible PDR" puede ser observada en la tabla 2. Los puntajes de AMR para antimicrobianos probados 10 veces o más se enumeran en la tabla 3. *E. coli* fue altamente susceptible a la

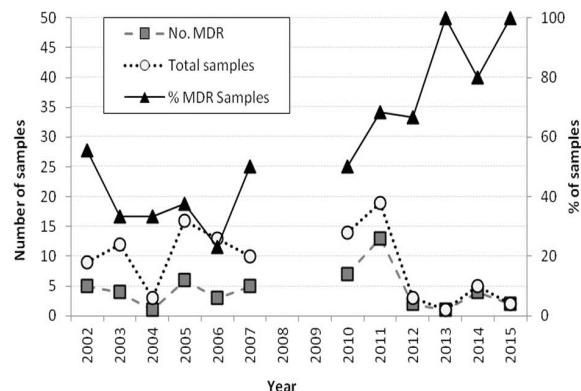


Figure 2. Yearly antimicrobial resistance findings from *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates obtained from <30 day old calves between 2002 and 2015. All isolates were classified in either "Sensitive" (low or no resistance found) or MDR - multi drug resistant: non-susceptible to at least ≥ 3 agent in ≥ 3 antimicrobial categories

Table 2. Antimicrobial resistance findings from *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates obtained from <30 day old calves between 2002 and 2015.

Isolate	No. (%) of isolates				Total
	Sensitive*	MDR	Possible XDR	Possible PDR	
<i>E. coli</i>	29(47.5)	9(14.8)	22(36.1)	1(1.6)	61(100)
β -hemolytic <i>E. coli</i>	15(55.5)	5(18.5)	1(3.7)	6(22.2)	27(100)
<i>Salmonella</i> spp.	11(57.8)	4(21.1)	0	4(21.1)	19(100)
Total	55	18	23	11	107

*Sensitive = non-susceptible to less than 1 agent in 3 antimicrobial categories.

MDR (Multi Drug Resistance) = non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories.

Possible XDR (Extensive Drug Resistance) = non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories.

Possible PDR (Pan Drug Resistance) = non-susceptible to all antimicrobial agents listed.

and oxytetracycline with 3 isolates each. No statistically significant differences were found (Kruskal-Wallis $p=0.27$) between treated, unknown treatment and untreated animals, with 20% of missing values.

DISCUSSION

Antimicrobial resistance is a major threat to human and animal health worldwide (13). Although it involves multiple animal species and multiple bacteria in very complex associations, studies typically address the topic a single species, single agent or single environment issue rather than the global situation (20,21). This work, although focused in dairy and beef calves in a particular region, proposes a new approach to antimicrobial resistance evaluation, allowing for easy visualization of global trends in multiple bacterial isolates for more than a decade of data (in this case, in *E. coli* and *Salmonella* spp.). This is important if we consider that resistance genes can be transferred among bacteria of different species in the environment (14). As observed in figure 1, the general antimicrobial resistance yearly scores do not show an evident tendency, with no steady increase or decrease of AMR yearly scores. Nevertheless, during the last study years 2011-2015 an increase in the yearly AMR score was observed. However, the number of isolates studied decreased, resulting in an increased variability of the sample. When summarizing the data in MDR (Figure 2), it can be observed that there was an increase in the percentage of MDR samples starting in 2011, although, as mentioned, the number of samples analyzed per year decreased.

Table 3. Antimicrobial resistance findings from *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates obtained from <30 day old calves between 2002 and 2015. All antimicrobials that were tested at least 10 times are included. n represents the number of isolates tested per antimicrobial agent.

<i>E. coli</i>	AMR* score	n
Ceftriaxone	1.0	12
Ceftiofur	1.1	19
Cefoperazone	1.1	14
Cefquinome	1.4	16
Danofloxacin	1.4	25
Florfenicol	1.6	55
Gentamicin	1.7	49
Enrofloxacin	1.8	41
Cefuroxime	1.9	22
Nalidixic acid	2.1	18
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2.3	57
Oxytetracycline	2.6	43
Amoxicillin	2.9	20
<i>E. coli</i> β -hemolytic	AMR* score	n
Florfenicol	1.4	27
Ceftiofur	1.4	16
Gentamicin	1.4	23
Danofloxacin	1.6	18
Enrofloxacin	1.6	25
Oxytetracycline	2.2	17
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2.5	20
Ampicillin	2.7	14
<i>Salmonella</i> spp.	AMR* score	n
Gentamicin	1.0	16
Danofloxacin	1.4	12
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1.8	19
Enrofloxacin	1.8	12
Florfenicol	1.8	18
Amoxicillin	2.2	12
Oxytetracycline	2.3	14

*Antimicrobial resistance results in 3 points and one sensitive result is 1 point for each specific drug. These are averaged by the number of test performed on each sample to produce the Antimicrobial Resistance Score. A drug with an AMR Score of 1 resulted in 100% sensitivity in all isolates tested. A score of 3, 100% resistance.

ceftriaxona (puntuación de AMR = 1.0) ceftiofur y cefoperazona (puntuación de AMR = 1.1); *E. coli* β -hemolítico para florfenicol, ceftiofur y gentamicina (puntuación AMR = 1.4); y *Salmonella* spp. a la gentamicina (puntuación AMR = 1.0).

De todos los aislamientos estudiados, el patrón de resistencia antimicrobiana se resumió en la tabla 4. El fenotipo de resistencia a múltiples fármacos más común observado en *E. coli* fue amoxicilina, cefuroxima, florfenicol, enrofloxacin,

Antimicrobial resistance patterns, as described in Table 4, show an important number of resistant isolates, with a very large variation on the phenotypic resistance patterns, that include resistance to most antimicrobial families. Samples show resistance to up to 7 different antimicrobials in 2 isolates. In our study, 76% of *E. coli* isolates showed resistance to 2 or more antimicrobials and 27% of *E. coli* isolates showed resistance to 4 or more antimicrobials. This is similar to results obtained in a large retrospective study in the US (21) where 71% of *E. coli* isolates showed resistance to 2 or more antimicrobials, and with results from Belgium (13), where an average resistance against at least one antimicrobial was found in 82.14% of *E. coli* isolates, similar to the 90% and 81% found in *E. coli* and β -hemolytic *E. coli* respectively in this study (Table 4).

Our findings are consistent with an environment where bacteria have been exposed to multiple drugs, quite possibly involving incorrect dosage and treatment periods. In this regard, a report on sub therapeutic treatments indicated that AMR treatments had only a limited impact on the nature of antimicrobial resistance in *E. coli*, most commonly describing resistance to tetracycline, sulfamethoxazole, ampicillin, chloramphenicol and streptomycin (22). On the other hand, our results contrast largely with findings from adult cattle at slaughter where over 90% of *E. coli* and *Salmonella* spp. samples showed no resistance at all (23). We found only 10% of *E. coli*, 19% of β -hemolytic *E. coli* and 29% of *Salmonella* spp. isolates sensitive to all antimicrobials tested, results similar to those previously reported, where 11.7-18.2 to 39% of *E. coli* isolates were all sensitive *E. coli* (24,25). Isolates in our study originated from sick calves, some of which had been subject of unsuccessful antimicrobial treatments. Moreover, all calves originated from premises with serious ongoing health events. Traditionally, calves are only submitted to a laboratory when treatments fail. In this context, it is interesting to observe that isolates from calves reported as "not treated" did not tend to be less resistant than those of calves reported as treated. These results are similar to findings in Canadian calves, where no association between previous treatment and AMR was found (26). This can be attributed either to poor records (in association to recall bias or failure to provide or register accurate information) or to the possibility that the untreated calves acquire highly resistant agents from the environment without having received treatment themselves.

We found no association between the calf age and AMR findings. These results agree with a study

oxitetraciclina y trimetoprima / sulfametoxazol (en 5 aislamientos); para la *E. coli* β -hemolítica, este fenotipo fue oxitetraciclina y trimetoprima / sulfametoxazol (en 4 aislamientos); y para *Salmonella* spp. fue florfenicol, trimetoprim / sulfametoxazol y amoxicilina, cefuroxima y oxitetraciclina con 3 aislamientos cada uno. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis $p = 0.27$) entre el tratamiento desconocido, y los animales tratados y no tratados, con el 20% de los valores faltantes.

DISCUSIÓN

La resistencia a antimicrobianos es una gran amenaza para la salud humana y animal en todo el mundo (13). A pesar de que involucra múltiples especies de animales y múltiples bacterias en asociaciones muy complejas, los estudios generalmente abordan el tema desde una sola especie, agente único o un solo entorno en lugar de la situación global (20,21). Este trabajo, aunque enfocado en terneros de carne y leche en una región particular, propone un nuevo enfoque para la evaluación de la resistencia antimicrobiana, que permite una fácil visualización de las tendencias globales en múltiples aislamientos bacterianos durante más de una década de datos (en este caso, en *E. coli* y *Salmonella* spp.). Esto es importante si consideramos que los genes de resistencia se pueden transferir entre las bacterias de diferentes especies en el medio ambiente (14). Como se observa en la figura 1, las puntuaciones anuales de resistencia general a los antimicrobianos no muestran una tendencia evidente, sin un aumento o disminución constante de las puntuaciones anuales de AMR. Sin embargo, durante los últimos años de estudio 2011-2015 se observó un aumento en la puntuación AMR anual. Sin embargo, el número de aislamientos estudiados disminuyó, lo que resultó en una mayor variabilidad de la muestra. Al resumir los datos en MDR (Figura 2), se puede observar que hubo un aumento en el porcentaje de muestras de MDR a partir de 2011, aunque, como se mencionó, el número de muestras analizadas por año disminuyó.

Los patrones de resistencia a los antimicrobianos, como se describe en la Tabla 4, muestran un número importante de aislamientos resistentes, con una gran variación en los patrones de resistencia fenotípica, que incluyen resistencia a la mayoría de las familias antimicrobianas. Las muestras presentan resistencia a hasta 7 antimicrobianos diferentes en 2 aislamientos. En nuestro estudio, el 76% de los aislamientos de *E. coli* mostraron resistencia a 2 o más

Table 4. Antimicrobial resistance patterns for *E. coli*, β -hemolytic *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates obtained from <30 day old calves between 2002 and 2015.

Antimicrobial resistance patterns*	No. (%) of isolates		
	<i>E. coli</i> (n=61)	β -Hem <i>E. coli</i> (n=27)	<i>Salmonella</i> spp. (n=19)
All sensitive	6 (10)	5 (19)	6 (32)
AMP	1 (2)		
GEN	3 (5)		
OXT	4 (7)	1 (4)	
SXT	1 (2)		1 (5)
AMP, CEF		2 (7)	
AMP, ENR		1 (4)	
AMP, SXT		1 (4)	
AMX, OXT	3 (5)		
FLO, SXT			3 (16)
GEN, OXT	2 (3)		
GEN, SXT	2 (3)		
NAC, OXT	1 (2)		
NAC, SXT	2 (3)		
OXT, SXT	4 (7)	4 (15)	1 (5)
AMP, OXT, SXT		1 (4)	
AMX, CEF, OXT	2 (3)		2 (11)
AMX, OXT, SXT	1 (2)		
CFQ, NAC, SXT	2 (3)		
GEN, AMP, CEF		1 (4)	
GEN, AMP, SXT	1 (2)		
GEN, CFC, SXT		2 (7)	
GEN, FLO, NAC	1 (2)		
GEN, FLO, SXT	1 (2)		
GEN, OXT, SXT	2 (3)		
AMP, CFC, OXT, SXT		2 (7)	
AMP, ENR, OXT, SXT		1 (4)	
AMX, CEF, ENR, OXT	1 (2)		1 (5)
AMX, CEF, OXT, SXT	1 (2)		
AMX, DAN, ENR, OXT	1 (2)		
AMX, ENR, OXT, SXT	1 (2)		
CEF, ENR, NAC, SXT	1 (2)		
CEF, FLO, DAN, ENR		1 (4)	
CEP, FLO, DOX, SXT		1 (4)	
FLO, DAN, NAC, SXT	1 (2)		
FLO, ENR, NAC, OXT			1 (5)
FLO, ENR, NAC, SXT	1 (2)		
GEN, AMP, OXT, SXT	1 (2)		
GEN, FLO, ENR, SXT	3 (5)		
AMP, AMX, DAN, ENR, SXT		1 (4)	
AMP, FLO, DAN, ENR, SXT		1 (4)	
AMX, CEF, FLO, ENR, OXT			1 (5)
AMX, CEF, FLO, OXT, SXT			1 (5)
AMX, FLO, ENR, OXT, SXT	3 (5)		
CFQ, DAN, NAC, OXT, SXT	1 (2)		
AMX, CEF, FLO, ENR, OXT, SXT	5 (8)		
AMX, FLO, DAN, ENR, OXT, SXT			2 (11)
GEN, AMX, FLO, DAN, OXT, SXT	1 (2)		
GEN, CEF, CEZ, FLO, DAN, ENR, SXT	1 (2)		
GEN, FLO, DAN, ENR, NAC, OXT, SXT		1 (4)	
GEN, AMP, AMX, FLO, DAN, ENR, DOX		1 (4)	

*AMP=ampicillin, GEN=gentamicin, OXT=oxytetracyclin, SXT=trimethoprim/sulfamethoxazole, CEF=cefuroxime, ENR=enrofloxacin, AMX=amoxicillin, CFQ=cefquinome, NAC=nalidixic acid, FLO=florfenicol, CFC=cefacertrile, DAN=danofloxacin, CEZ=cefuroxime, DOX=doxycyclin.

antimicrobianos y el 27% de los aislamientos de *E. coli* mostraron resistencia a 4 o más antimicrobianos. Esto es similar a los resultados obtenidos en un gran estudio retrospectivo en EE. UU. (21) donde el 71% de los aislamientos de *E. coli* presentaron resistencia a 2 o más antimicrobianos y con resultados de Bélgica (13), donde una resistencia promedio contra al menos un antimicrobiano se encontró en el 82.14% de los aislamientos de *E. coli*, similar al 90% y al 81% encontrados en *E. coli* y *E. coli* β -hemolítica respectivamente (Tabla 4).

Nuestros hallazgos son consistentes con un entorno en el que las bacterias han estado expuestas a múltiples fármacos, posiblemente con dosis y períodos de tratamiento incorrectos. En este sentido, un informe sobre tratamientos subterapéuticos indicó que los tratamientos con AMR tuvieron un impacto limitado en su naturaleza de la resistencia a los antimicrobianos en *E. coli*, describiendo más comúnmente la resistencia a la tetraciclina, sulfametoxazol, ampicilina, cloranfenicol y estreptomina (22). Por otro lado, nuestros resultados contrastan en gran medida con los hallazgos del ganado adulto de sacrificio donde más del 90% de la muestras de *E. coli* y *Salmonella* spp. no mostraron resistencia en absoluto (23). Encontramos solo 10% de *E. coli*, 19% de *E. coli* β -hemolítica y 29% de *Salmonella* spp. los aislamientos sensibles a todos los antimicrobianos evaluados arrojan resultados similares a los reportados previamente, donde 11.7-18.2 a 39% de los aislamientos de *E. coli* fueron todos sensibles a *E. coli* (24,25). Los aislamientos en nuestro estudio se originaron a partir de terneros enfermos, algunos de los cuales habían sido sujetos a tratamientos antimicrobianos fallidos. Por otra parte, todos los terneros provenían de fincas con graves eventos de salud en curso. Tradicionalmente, los terneros solo se envían a un laboratorio cuando fracasan los tratamientos. En este contexto, es interesante observar que los aislamientos de terneros reportados como "no tratados" no tienden a ser menos resistentes que los de los terneros reportados como tratados. Estos resultados son similares a los hallazgos en terneros canadienses, donde no se encontró asociación entre el tratamiento previo y la RAM (26). Esto puede atribuirse a registros deficientes (en asociación con un sesgo de recuento o la imposibilidad de proporcionar o registrar información precisa) o a la posibilidad de que los terneros no tratados adquieran agentes altamente resistentes del medio ambiente sin haber recibido el tratamiento.

No se encontró asociación alguna entre la edad del ternero y los hallazgos de la RAM. Estos resultados concuerdan con un estudio que no observó ningún efecto de la edad sobre la resistencia a los

that observed no effect of age on antimicrobial resistance in calves, while evaluating the effect on housing type and resistance (25). In contrast, other studies reported an effect of age in AMR (14,26). Nevertheless, it has been reported that ampicillin-resistant *E. coli* levels were typically low in the first 8 months of age (27), and our specimens were from calves <30 days of age.

Multi-resistant strains in very young calves was found, perhaps indicating that isolates had insufficient time to mutate in the host. These multi-resistant bacteria could have originated from the environment and likely reflect a complex exchange, genetic mixing and relationships among bacterial populations, hosts and the environment (28,29). These largely unknown processes could result in the finding of highly resistant bacteria in young calves, no increase in resistance with age (or even a decrease) and, no clearly defined trend at the yearly level. Furthermore, no statistical association was found between calf sex and AMR score, as previously reported (26).

The main limitations of this study were that samples submitted were a convenience sample of farms and therefore not representative of a larger population. Nevertheless, these results may be a good estimation of the situation regarding AMR in farms under treatment in normal field conditions, sometimes with poor veterinary supervision, no antimicrobial resistance evaluation, prior treatment and poor antibiotic administration practices and inaccurate dosage. Also, as in most retrospective studies, data records were not necessarily complete or accurate. Records were collected for practical purposes and future research is normally not considered as relevant at the time of collection. Finally, the number of samples received per year was highly variable and, for reasons not clear to the authors, very few isolates were received between 2013 and 2015.

At the practical level, it is important to note that this retrospective study allowed researchers to describe available data to provide useful information for veterinary practitioners and farmers. Based on our results, it is evident that antimicrobials like oxytetracycline and amoxicillin should be avoided when treating suspected *E. coli* diarrhea cases, and that ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole are ineffective alternatives. These findings are similar to extensive AMR to tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole found in Canada in 2008 (30). Also, in cases of suspected *Salmonella* spp. outbreaks in calves, amoxicillin and oxytetracycline should be avoided due to

antimicrobianos en terneros, al tiempo que evaluó el efecto sobre el tipo de vivienda y resistencia (25). En contraste, otros estudios informaron un efecto de la edad en la RAM (14,26). Sin embargo, se ha informado que los niveles de *E. coli* resistentes a la ampicilina eran típicamente bajos en los primeros 8 meses de edad (27), y nuestras muestras eran de terneros <30 días de edad.

Se encontraron cepas multirresistentes en terneros muy jóvenes, lo que tal vez indica que los aislamientos no tuvieron tiempo suficiente para mutar en el huésped. Estas bacterias multirresistentes podrían haberse originado en el medio ambiente y probablemente reflejen un intercambio complejo, mezcla genética y relaciones entre las poblaciones bacterianas, huéspedes y el medio ambiente (28,29). Estos procesos, en gran parte desconocidos, podrían dar como resultado el hallazgo de bacterias altamente resistentes en terneros jóvenes, no aumento de la resistencia con la edad (o incluso una disminución) y no existencia de una tendencia claramente definida a nivel anual. Adicionalmente, no se encontró asociación estadística entre el sexo de los terneros y la puntuación de AMR, como se informó anteriormente (26).

Las principales limitaciones de este estudio fueron que las muestras enviadas fueron una muestra de voluntaria de las granjas a conveniencia y, por lo tanto, no representativas de una población más grande. Sin embargo, estos resultados pueden ser una buena estimación de la situación con respecto a la AMR en granjas bajo tratamiento en condiciones de campo normales, a veces con supervisión veterinaria deficiente, sin evaluación de resistencia antimicrobiana, tratamiento previo y malas prácticas de administración de antibióticos y dosis inexactas. Además, como en la mayoría de los estudios retrospectivos, los registros de datos no fueron necesariamente completos ni precisos. Los registros se recopilaron con fines prácticos y las investigaciones futuras normalmente no se consideran relevantes en el momento de la recopilación. Finalmente, el número de muestras recibidas por año fue muy variable y, por razones no claras para los autores, se recibieron muy pocos aislamientos entre 2013 y 2015.

A nivel práctico, es importante señalar que este estudio retrospectivo permitió a los investigadores describir los datos disponibles para proporcionar información útil a los veterinarios y agricultores. Con base en nuestros resultados, es evidente que los antimicrobianos como la oxitetraciclina y la amoxicilina deben evitarse al tratar casos sospechosos de diarrea por *E. coli*, y que la ampicilina y el trimetoprim / sulfametoxazol son alternativas ineficaces. Estos hallazgos son similares

extensive resistance. These results are similar to what was found in central New York, where ampicillin was also found as a prevalent AMR phenotype among other resistances (25). Ceftiofur should be the recommended treatment for *E. coli* diarrheas, while gentamicin appears to be the recommended antimicrobial for *Salmonella* spp. outbreaks, in the lack of an antimicrobial resistance evaluation. It is relevant to note that not a single isolate showed resistance to ceftriaxone, a drug that is not approved in Chile for veterinary use and therefore the exposure of these bacterial field strains was expected to be close to 0. This drug could work as an AMR control group, indicating the expected level of AMR to an antimicrobial not available in the market.

Acknowledgments

We thank the laboratory and necropsy hall technicians for all their work in providing and processing samples. This study was partially funded by *U-Inicia* VID Project N°121017019102106 from Universidad de Chile.

Conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

a la amplia AMR a tetraciclina y trimetoprima / sulfametoxazol encontrados en Canadá en 2008 (30). Además, en casos de sospecha de brotes de *Salmonella* spp. en terneros deben evitarse la amoxicilina y oxitetraciclina debido a la resistencia. Estos resultados son similares a los encontrados en el centro de Nueva York, donde la ampicilina también se encontró como un fenotipo de RMA prevalente entre otras resistencias (25). Ceftiofur debe ser el tratamiento recomendado para las diarreas de *E. coli*, mientras que la gentamicina parece ser el antimicrobiano recomendado para los brotes de *Salmonella* spp., ante la falta de una evaluación de la resistencia a los antimicrobianos. Es relevante señalar que ni un solo aislamiento presentó resistencia a la ceftriaxona, un medicamento que no está aprobado en Chile para uso veterinario y, que por lo tanto, se esperaba que la exposición de estas cepas de campo bacteriano fuera cercana a 0. Este medicamento podría funcionar como un grupo de control AMR, que indica el nivel esperado de AMR para un antimicrobiano no disponible en el mercado.

Agradecimientos

Agradecemos a los técnicos de laboratorio y sala de necropsia por todo su trabajo en el suministro y procesamiento de muestras. Este estudio fue parcialmente financiado por U-Inicia VID Proyecto N° 121017019102106 de la Universidad de Chile.

Conflicto de Intereses

El (los) autor (es) no declararon conflictos de interés potenciales con respecto a la investigación, autoría y / o publicación de este artículo.

REFERENCES

1. Merle R, Hajek P, Käsbohrer A, Hegger-Gravenhorst C, Mollenhauer Y, Robanus M, et al. Monitoring of antibiotic consumption in livestock: A German feasibility study. *Prev Vet Med* 2012; 104(1-2):34–43.
2. WHO. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. URL Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/665/112642/1/9789241564748_eng.pdf
3. Acar JF, Moulin G. Integrating animal health surveillance and food safety: the issue of antimicrobial resistance. *Rev Sci Tech* 2013; 32(2):383–392.
4. Heuer OE, Hammerum AM, Collignon P, Wegener HC. Food Safety: Human Health Hazard from Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Food. *Clin Infect Dis* 2006; 43(7):911–916.
5. WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3rd Revision 2011. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. URL Available from: http://apps.who.int/iris/tst/r/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf
6. Zawack K, Li M, Booth JG, Love W, Lanzas C, Gröhn YT. Monitoring antimicrobial resistance in the food supply chain and its implications for FDA policy initiatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2016 22;60(9):5302–5311.

7. Ungemach FR, Müller-Bahrndt D, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(41):33-38.
8. Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* 2011; 6:e23415.
9. Lapiere L, San Martin B, Araya-Jordan C, Borie C. Comparison of integron-linked antibiotic resistance genes in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine in Chile in 2005 and 2008. *Can J Microbiol* 2010; 56(6):515-521.
10. San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, León B, Espinoza S, et al. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Arch Med Vet* 2002; 34(2):1-13.
11. San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, Iragüen D, Espinoza S, et al. Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated From Dairy Herds in Chile. *Int J Appl Res* 2003; 1(1):1-8.
12. San Martín B, Bravo V, Borie C. Antimicrobial resistance monitoring in cattle in Chile using *E. coli* as the indicator bacteria. *Arch Med Vet* 2005; 37(2):117-123.
13. Hanon J-B, Jaspers S, Butaye P, Wattiau P, Méroc E, Aerts M, et al. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011-2014). *Prev Vet Med* 2015; 122(4):443-452.
14. Hille K, Fischer J, Falgenhauer L, Sharp H, Brenner GM, Kadlec K, et al. On the occurrence of extended-spectrum- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in livestock: results of selected European studies. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2016; 127(9-10):403-11.
15. Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E, et al. Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(5):472-477.
16. Bager F. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14(4):271-4
17. Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ* 1998; 317(7159):647-650.
18. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
19. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(3):268-281.
20. Checkley SL, Campbell JR, Chirino-Trejo M, Janzen ED, McKinnon JJ. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* obtained from beef cattle on arrival at the feedlot and prior to slaughter, and associations with volume of total individual cattle antimicrobial treatments in one western Canadian feedlot. *Can J Vet Res* 2008; 72(2):101-108.
21. Cummings KJ, Divers TJ, McDonough PL, Warnick LD. Fecal shedding of *Salmonella* spp among cattle admitted to a veterinary medical teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234(12):1578-1585.
22. Mirzaaagha P, Louie M, Sharma R, Yanke LJ, Topp E, McAllister TA. Distribution and characterization of ampicillin- and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. *BMC Microbiol* 2011;11:78.
23. Barlow RS, McMillan KE, Duffy LL, Fegan N, Jordan D, Mellor GE. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* from Australian Cattle Populations at Slaughter. *J Food Prot* 2015; 78(5):912-920.
24. Berge ACB, Moore DA, Sischo WM. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(6):3872-3878.
25. Pereira R V, Siler JD, Ng JC, Davis MA, Warnick LD. Effect of preweaned dairy calf housing system on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 2014; 97(12):7633-7643.

26. Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(12):3658–3666.
27. Hoyle DV, Shaw DJ, Knight HI, Davison C, Pearce M, Low JC, et al. Age-related decline in carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in young calves. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(11):6927–6930.
28. Dantas G, Sommer MOA. Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15(5):577–582.
29. Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol* 2010; 44(2):580–587.
30. Gow SP, Waldner CL, Rajic A, McFall ME, Reid-Smith R. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian cow-calf herds. Part I--beef calves. *Can J Vet Res* 2008; 72(2):82–90.