




## Evaluación de resistencia a antibióticos en muestras de heces de terneros con diarrea en la región Cajamarca, Perú



Marco Antonio Cabrera González <sup>a</sup>

Héctor Vladimir Vásquez Pérez <sup>b</sup>

Carlos Quilcate-Pairazamán <sup>b</sup>

José Bazán-Arce <sup>a</sup>

Medali Cueva-Rodríguez <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Estación Experimental Baños del Inca. Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario, Jr. s/n Wiracocha, Baños del Inca, Cajamarca 06004, Perú.

<sup>b</sup> INIA. Dirección de Desarrollo Tecnológico Agrario, La Molina. Lima. Perú.

\*Autor de correspondencia: [mcuevar@unc.edu.pe](mailto:mcuevar@unc.edu.pe)

### Resumen:

La diarrea está asociada con bacterias infecciosas que ocasionan mortalidad en terneros como *Escherichia coli*, representando un problema para los productores de leche y carne a nivel global, provocando grandes pérdidas económicas. En este estudio se evaluó la resistencia a cepas de *E. coli* aisladas de heces diarreicas de terneros recién nacidos de la región Cajamarca. Se recolectaron 52 muestras de heces de terneros de cinco provincias de la región Cajamarca para el aislamiento de *E. coli* en agar MacConkey con sorbitol. La identificación molecular de *E. coli* se realizó mediante la amplificación del gen *uidA* por PCR convencional y luego se evaluó la susceptibilidad/resistencia a antibióticos utilizando la metodología de Kirby-Bauer y el uso de discos de antibiótico con neomicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim y enrofloxacin. Los resultados fueron que el 96.15 % de cepas de *E. coli* fueron resistentes a tetraciclina, el 51.92 % a sulfametopim, el 26.92 % a neomicina y el 9.61 % a enrofloxacin. También se demostró que el 30.76 % presentaban resistencia a dos fármacos, el 19.23 % a tres fármacos y el 5.76 % a cuatro fármacos; se encontró diferencia significativa de resistencia a tetraciclina

( $P < 0.0001$ ). Se concluye que los terneros neonatos de la región Cajamarca que presentaban diarrea son portadores de *E. coli* resistentes a antibióticos, representando un problema para los criadores de ganado vacuno, ya que estas cepas pueden causar la muerte de los animales y contribuyen a la diseminación de la resistencia de antibióticos.

**Palabras clave:** Resistencia, Antibióticos, *E. coli*, Terneros, Diarrea.

Recibido: 17/11/2022

Aceptado: 05/05/2023

## Introducción

La diarrea en terneros ha sido relacionada con patógenos infecciosos, representando un reto para los que se dedican a la producción de leche y carne a nivel global<sup>(1)</sup>. Las bacterias infecciosas más importantes que causan la mortalidad asociada a la diarrea en terneros son *E. coli* y *Salmonella*<sup>(2)</sup>, generando grandes pérdidas económicas sino se trata a tiempo la enfermedad con antimicrobianos apropiados y terapia de apoyo<sup>(2,3)</sup>. Se han utilizado los antibióticos en animales para el tratamiento de enfermedades, prevención y control de infecciones comunes<sup>(4,5)</sup>; sin embargo, el uso inadecuado y excesivo de antibióticos contribuye a la resistencia antimicrobiana amenazando la salud de animales y humanos<sup>(6)</sup>. En relación a los animales que son destinados al sacrificio y finalmente al consumo de los humanos, estos actúan como reservorios de cepas resistentes a los antimicrobianos<sup>(7)</sup>.

Por ejemplo, se ha reportado que, en las granjas lecheras de Egipto, se han aislado cepas de *E. coli* a partir de heces diarreicas de terneros que fueron resistentes a ampicilina<sup>(8)</sup>. Las terneras eliminan frecuentemente microorganismos a través de sus heces, generando la diseminación de bacterias en el ambiente de la granja, lo que podría causar infecciones en los demás animales. Se han obtenido aislamientos de *E. coli* provenientes de heces de terneras lecheras que presentan resistencia a múltiples antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas y se determinó el gen *iucD* como el más prevalente<sup>(9)</sup>. Asimismo, en otros estudios se menciona sobre el operón de aerobactina (*iucD*), que produce cuatro tipos de sideróforos: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina. Los genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos son encontrados en cepas uropatógenas (UPEC) y cepas comensales; sin embargo, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina son localizados en islas de patogenicidad asociados a UPEC, pero no en cepas comensales, sugiriendo que los sistemas de captación de hierro fueron adquiridos por transferencia horizontal de genes. La aerobactina es un sideróforo presente en la mayoría de las cepas UPEC, teniendo una gran estabilidad en la unión al  $\text{Fe}^{3+}$  y es uno de los encargados en el secuestro de hierro durante una infección del tracto urinario (ITU), la combinación de genes de adherencia/captación de hierro/toxicidad muestra la elevada virulencia y el potencial de daño que poseen las cepas para causar una ITU<sup>(9,10)</sup>.

Por otro lado, la red francesa de monitoreo sobre resistencia a los antimicrobianos en animales enfermos indicó que cepas de *E. coli* portadoras de la mayoría de resistencias han sido aisladas de heces diarreicas de terneros neonatales<sup>(10)</sup>, siendo la amoxicilina, tetraciclina y estreptomina los principales antibióticos a los que se ha generado resistencia<sup>(7,11)</sup>.

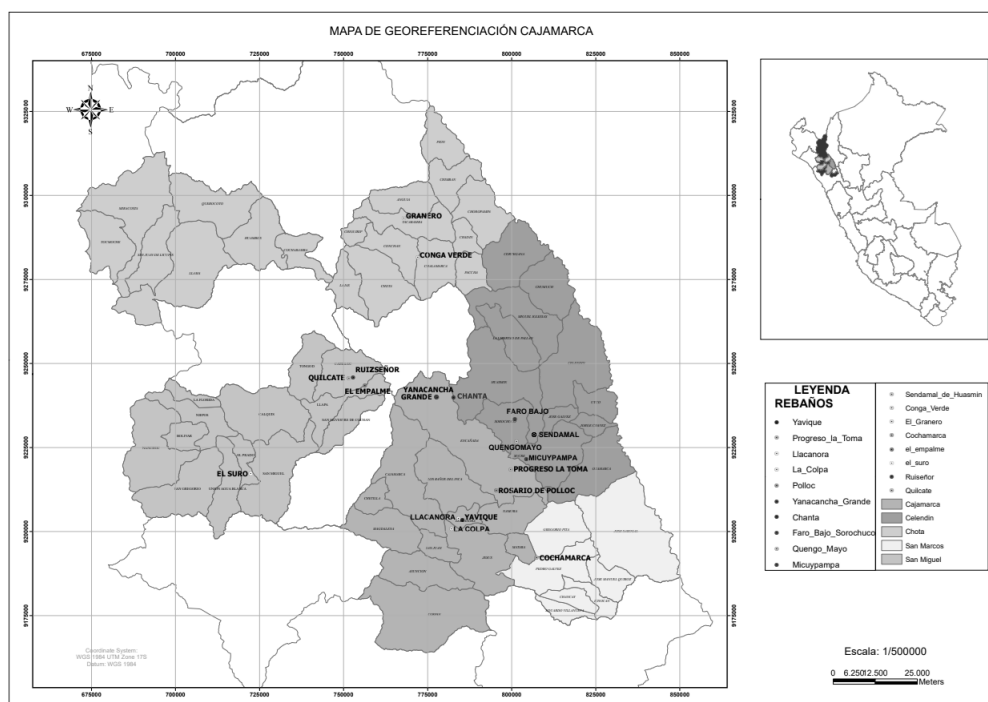
Es necesario reportar la resistencia que se viene generando a múltiples tipos de antibióticos para tener en cuenta su control y uso adecuado en bovinos, debido a que representa un peligro para la salud pública. Además, existen muy pocos estudios de resistencia a antibióticos en bovinos neonatos en el Perú, siendo este estudio un aporte para tener conocimiento de la situación actual. El objetivo de la investigación fue evaluar la resistencia de antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de heces diarreicas de terneros recién nacidos provenientes de cinco provincias de Cajamarca.

## **Material y métodos**

### **Localización del estudio**

Se trabajó en 18 establos productores de leche bajo un sistema semi intensivo, los cuales están ubicados en la provincia de Chota, San Miguel, Celendín, San Marcos y Cajamarca, región de Cajamarca, Perú. Se logró recolectar un total de 52 muestras de terneros con diarrea hasta el primer mes de vida, de los cuales 35 terneros fueron machos y 17 terneros hembras, en época de lluvia (noviembre 2020 – mayo 2021) (Figura 1). Las muestras de heces (aproximadamente 3 g) se obtuvieron de manera directa del recto mediante el uso de bolsas estériles de polietileno de primer uso, estas muestras se identificaron y se llevaron en caja de tecnopor conteniendo hielo al laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca, donde se realizó el aislamiento de *E. coli* del total de las muestras.

**Figura 1:** Ubicación geográfica de los establos que participaron en el estudio, de las provincias de Chota, San Miguel, Celendín, San Marcos y Cajamarca, región de Cajamarca, Perú



### Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Con una asa bacteriológica estéril se sembraron 300  $\mu$ l de heces en agar MacConkey II con sorbitol (Becton, Dickinson and Company® Loveton Circle Sparks, MD 21152, USA), posteriormente se incubó a 37 °C durante 24 h en estufa (Estufa universal Memmert UN-110/ Schwabach/Alemania), se aislaron colonias con morfología y desarrollo típico como son colonias de color rojo brillante las que se consideraron como *E. coli*.

### Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Escherichia coli*

Tres colonias de *E. coli* seleccionadas que crecieron en el agar MacConkey II con sorbitol se cultivaron en medio líquido de crecimiento y multiplicación microbiana 2xYT medium (Sigma, REF. Y2377) a 37 °C por 18 h; el crecimiento bacteriano se determinó mediante concentración de valores predispuestos en el espectrofotómetro (PCR MAX Lambda 64272, Bibby Scientific Ltd. Reino Unido), se realizó el cálculo de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a 600 nm, determinando el crecimiento de bacterias viables en el medio de crecimiento. Para la obtención de la plantilla de ADN de *E. coli* se utilizó el kit de purificación Wizard® Genomic DNA (Promega, REF. A1120), con las indicaciones del fabricante, se almacenó el ADN en microtubos de polipropileno

(Eppendorf™) de 1,500 µl en refrigeración, para lo cual se utilizó una refrigeradora Samsung, RT35K5930S8/PE, Samsung, México de 4 °C, utilizado para los distintos procesos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### **Identificación molecular de *Escherichia coli***

La identificación molecular de *E. coli* se realizó mediante PCR empleando “cebadores” (F5'-TCAGCGCGAAGTCTTTATACC-3', R5'-CGTCGGTAATCACCATTC-3'), para la amplificación del gen *uidA* (248 pb)<sup>(11,12,13)</sup>. En la reacción de PCR se utilizó 1 µl (10 mM) de F y R de cada cebador, 7.7 µl de agua de grado molecular y 12.5 µl de G2 Green Master Mix (Promega, Madison, EE. UU), como templado se utilizó 2.8 µl de ADN a concentración de 50 µg/ml. El perfil térmico de la reacción de PCR fue: desnaturalización 94 °C/ 2 min, 25 ciclos desnaturalización 94 °C/30 seg, hibridación 55 °C/30 seg, extensión 72 °C/45 seg; extensión final 72 °C/2 min. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia JM 109 de *Escherichia coli* (Promega, REF L2004). Los fragmentos de ADN amplificado (248 pb) para identificar cepas de *E. coli* se separaron por su peso molecular mediante electroforesis – agarosa 1%. Los fragmentos se analizaron mediante tinción en geles de agarosa con Sybr Green (Thermo Fisher) y se observaron en un transiluminador UV 302 nm Labnet U1001 Taiwán.

### **Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos**

Para la evaluación de susceptibilidad/resistencia de las cepas de *E. coli* a los antibióticos se utilizó la metodología de Kirby-Bauer donde se tuvo como referencia parámetros establecidos para bacterias que se aislaron de animales por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)<sup>(14)</sup> (Cuadro 1). Antes de la realización de la prueba de susceptibilidad se preparó agar Mueller Hinton (Merck KGaA 64271, Darmstadt Germany) específico para determinar la sensibilidad de patógenos de importancia clínica según instrucciones del fabricante, y se esterilizó en autoclave (Autoclave digital automática AVDA050 Litros, Biogenics Lab, Perú); posteriormente se vertió en placas Petri de 35 mm de diámetro / 10 mm de alto y fueron sembrados dos o tres colonias aisladas con asa bacteriológica, se incubaron utilizando incubadora (Mettler CO<sub>2</sub> ICO50 GmbH + Co. KG) en condiciones de aerobiosis por 18 h a 37 °C. La susceptibilidad a los antimicrobianos de todas las colonias aisladas se determinó frente a neomicina-N 30 µg, tetraciclina-TE 30 µg, sulfametoxazol-trimetropim-SXT 25 µg y enrofloxacin-ENR 5 µg (Discos - Thermo Scientific™); la sensibilidad de las cepas aisladas se clasificó como sensible, intermedio o resistente midiendo el halo de inhibición de acuerdo a los parámetros establecidos por el CLSI<sup>(14)</sup>.

**Cuadro 1:** Interpretación de las pruebas de sensibilidad a antibióticos, por el método de difusión por discos (diámetro de la zona de inhibición)

Antibiótico	Concentración del disco ( $\mu\text{g}$ )	Sensible	Resistencia intermedia	Resistente
Tetraciclina	30	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$
Sulfametropim	25	$\geq 16$	11-15	$\leq 10$
Neomicina	30	$\geq 17$	13-16	$\leq 12$
Enrofloxacina	5	$\geq 23$	17-22	$\leq 16$

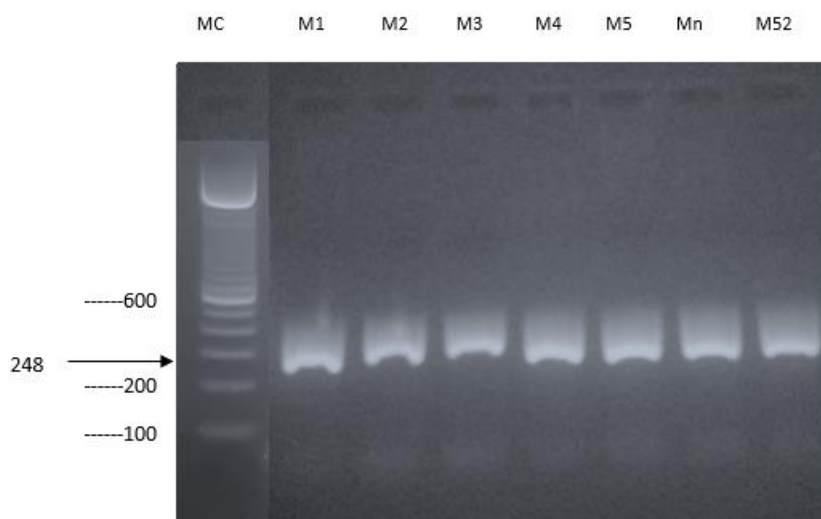
### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el software Graph Pad Prism 9.3.1 (Prism Software, Irvine, CA, USA). La normalidad de los datos fue determinada mediante “Kolmogorov-Smirnoff”. El análisis de varianza (ANOVA), seguido por el análisis de comparaciones múltiples de “Tukey” para evaluaciones entre antibióticos (parámetros relacionados a sensibilidad, resistencia). La información obtenida se consideró estadísticamente significativa a una  $P < 0.05$ .

### Resultados

Del total de muestras se seleccionaron un total de 52 con crecimiento positivo de *E. coli* en agar Mack Conkey II al Sorbitol. La identificación molecular de *E. coli* presente en heces de terneros con diarrea, se amplificó el gen *uidA* el cual codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa<sup>(12,13,14)</sup>. El procesamiento de los productos de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, método simple y eficaz para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN con un tamaño molecular de 0.5 a 25 kb. Se observaron bandas electroforéticas del tamaño esperado: 248 pb positivas para la región amplificada del gen *uidA*. El mismo fue detectado en las 52 muestras analizadas, evidenciando la identificación de *E. coli*, dado que este gen es específico para la bacteria (Figura 2) de lo cual el 63.30 % (n=35) correspondían a terneros machos y el 32.69 % (n=17) procedían de terneros hembras.

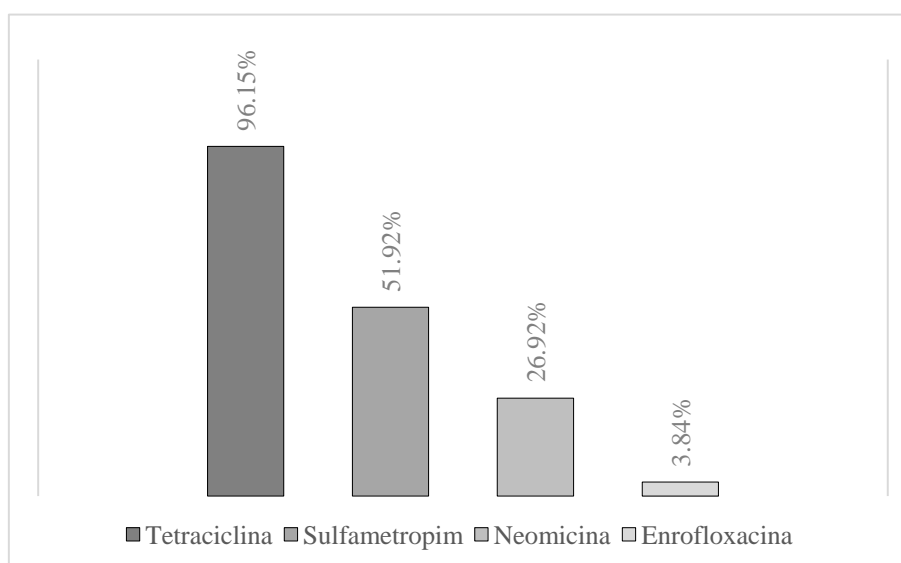
**Figura 2:** Amplificación del gen *uidA* de muestras de heces de terneros mediante electroforesis en geles de agarosa (1%)



Carril 1 marcador de 100 pb. Muestras positivas en todos los carriles n=52.

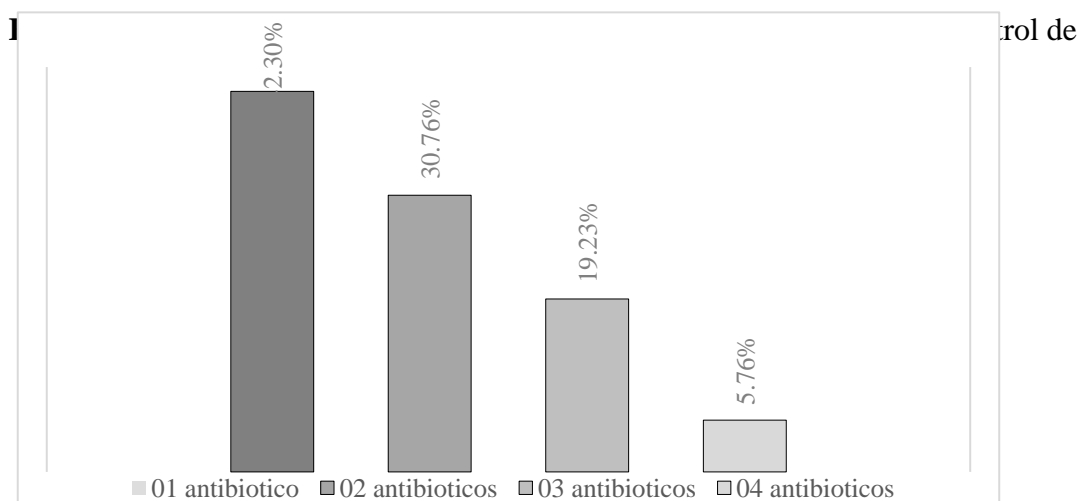
Se analizó la presentación de susceptibilidad/resistencia a los fármacos de muestras de heces diarreas de terneros donde se pudieron observar diferentes porcentajes de resistencia; gran parte de cepas de *E. coli* presentaron resistencia a la tetraciclina (96.15 %, 50/52) así mismo, mayor al 50 % de las muestras fueron resistentes a sulfametoxazol-trimetropim (51.92 %, 27/52), seguido con un porcentaje importante de resistencia a la neomicina (26.92 %, 14/52), además, se observó menor resistencia a enrofloxacin (9.61 %, 5/52) (Figura 3).

**Figura 3:** Porcentaje de cepas de *E. coli* con características de resistencia a cuatro fármacos



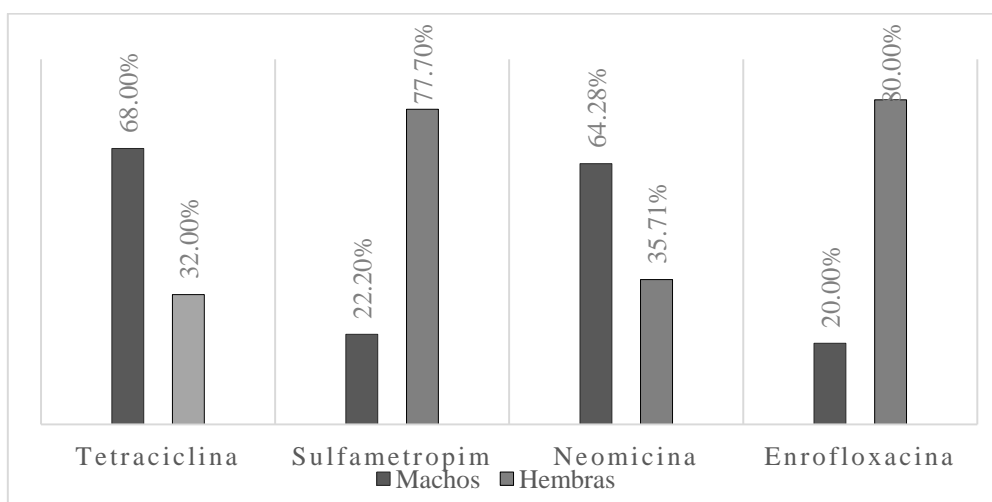
Se determinó también la presentación de la resistencia de antibióticos en cuanto a la variación de las cepas aisladas en cada ternero, la mayoría presentaban resistencia a uno

(42.30 %, 22/52) y dos (30.76 %, 16/52) fármacos, el problema se agrava en un número importante de terneros presentándose resistencia múltiple en las cepas aisladas de *E. coli* observándose resistencia a tres (19.23 %, 10/52) y cuatro (5.76 %, 3/52) fármacos, siendo la resistencia a tetraciclina la más común en todos; además, la resistencia a enrofloxacin fue la que en menor proporción se presentó en las cepas aisladas (Figura 4).



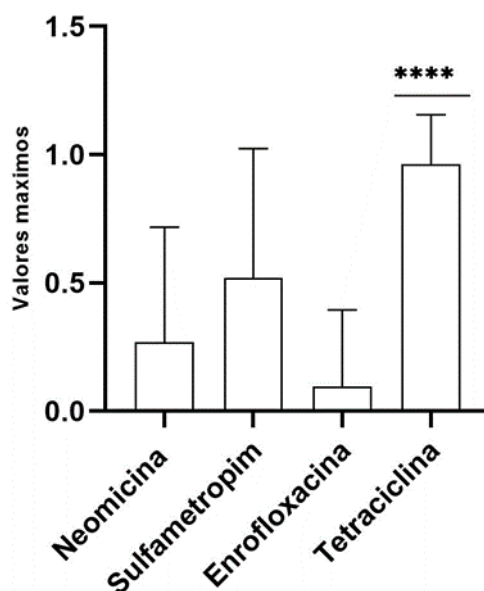
Se observó que la presentación de resistencia se mostró tanto en machos y hembras, observándose porcentajes de resistencia mayores en machos para tetraciclina (68 %) y neomicina (64.28 %) respectivamente; pero curiosamente en cuanto a las hembras pudo observarse que la resistencia a los fármacos sulfametopim (77.70 %), enrofloxacin (80 %) fue mayor con respecto a los machos (Figura 5).

**Figura 5:** Porcentaje de los fármacos más utilizado en el control de colibacilosis en terneros



Al análisis estadístico pudo encontrarse diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) en cuanto a la presentación de resistencia de las cepas de *E. coli* procedente de muestras de terneros con diarrea a la tetraciclina (Figura 6).

**Figura 6:** Diferencia estadística de resistencia de cepas de *E. coli* a tetraciclina



( $P < 0.0001$ ). Los datos están expresados en valores absolutos y porcentaje (%).

## Discusión

La *E. coli* se constituye como uno de los principales agentes bacterianos en producir infección urinaria en animales, septicemia y diarrea en animales de granja; el fenómeno de resistencia que expresan las cepas de *E. coli* a los fármacos usados en su control presentan fallo terapéutico, además, se están observando muchos casos de resistencia múltiple que aumenta a nivel mundial, convirtiéndose la diseminación de la resistencia en un problema de salud pública<sup>(15,16)</sup>.

En esta investigación se pudo determinar diferentes características de resistencia a los antibióticos y con distintos porcentajes, lo cual ha permitido determinar que el fallo terapéutico a los antibióticos que expresa la bacteria en terrenos criados en los establos de ganado productores de leche en el región de Cajamarca – Perú está muy difundido, lográndose identificar que todas las cepas aisladas de *E. coli* muestran resistencia; así se pudo observar mayor porcentaje de resistencia a tetraciclina y con un importante porcentaje de resistencia múltiple con mayor prevalencia a dos fármacos, seguido a tres y cuatro antibióticos evaluados.

Los datos obtenidos de resistencia a los antibióticos en la región Cajamarca, permite mencionar que se da por la falta de registros de control sanitario en los rebaños, haciendo difícil realizar la trazabilidad de los fármacos utilizados y según versión de los

propietarios algunos de estos animales cuando presentan esta signología de la enfermedad son tratados con antibióticos y otros no, pero todos presentaron resistencia al menos a un antibiótico analizado, lo que permite mencionar que la resistencia podría deberse al mal uso de antibióticos por parte de los criadores, siendo utilizados de manera frecuente<sup>(17)</sup> y se recomienda el monitoreo del ternero mediante reconstitución de electrolitos y en lo posible no administrar antibióticos por la presentación de resistencia a estos fármacos<sup>(18)</sup>.

Otra posible causa de esta resistencia generalizada a los antibióticos podría ser que la mayoría de terneros tratados y principalmente en terneros no tratados, posiblemente este fenómeno se deba a que la leche y calostro provenientes de vacas que han sido tratadas con algún antibiótico facilita la presencia de residuos de antibióticos en la leche, aumentando la presión de selección de cepas de *E. coli*, con lo cual se seleccionan cepas resistentes, praxis muy instaurada en la ganadería regional de Cajamarca<sup>(19,20,21)</sup> además, se puede asumir que hay difusión de genes entre cepas comensales y patógenas de resistencia a los antibióticos entre animales y rebaños incrementando los niveles de resistencia<sup>(22,23,24)</sup>.

El patrón de resistencia observado en cepas aisladas de *E. coli* tiene un orden de mayor a menor prevalencia la tetraciclina, sulfametopim, neomicina y enrofloxacin en menor proporción, resultados comunes que también fueron obtenidos por otros investigadores que reportan un patrón de resistencia a tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas y fluoroquinolonas<sup>(25)</sup>, cefalotina, tetraciclina, trimetoprima-sulfadiazina, ampicilina<sup>(26)</sup>, el patrón de multiresistencia más común fue ampicilina-kanamicina-estreptomicina-sulfametoxazol-tetraciclina<sup>(27)</sup>.

El fenotipo de resistencia más frecuente de cepas de *E. coli* fue a la tetraciclina 96.15 % (50/52), esto posiblemente se debe a que cepas de *E. coli* porten fenotipos resistentes a tetraciclina por el uso inadecuado del fármaco por parte de los productores, que ha generado mayor presión de selección en cepas portadoras de genes que confieren resistencia a tetraciclina, contribuyendo mediante difusión de cepas la transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos<sup>(28)</sup>; además, estas cepas se constituyen en posibles fuentes que diseminan la resistencia al medio ambiente cuando se esparce el estiércol en las zonas de pastoreo como el abono<sup>(29)</sup>.

La presencia de resistencia de las cepas locales de *E. coli* a tetraciclina es generalizada con base en su utilización de amplio espectro en salud animal, como reservorio de bacterias gram negativas con genes de resistencia a tetraciclina como fuente de infección y con mayor prevalencia en *E. coli* causante de diarrea en terneros, problemática frecuente que también ha sido reportada en otras investigaciones con resultados similares<sup>(30,31,32)</sup>.

Es muy importante determinar los genes que están involucrados en estos procesos de resistencia relacionados a la utilización de estos fármacos, como genes de adhesión, transportadores de hierro<sup>(33,34)</sup>, como es el caso del gen *iucD*<sup>(9,35)</sup>, además, los procesos de transferencia horizontal de genes, la presión de selección, que provoca el uso

indiscriminado de antibióticos<sup>(36,37)</sup>, todo lo mencionado es conocimiento necesario para evaluar los procesos de tratamiento y control de diarrea en terneros en la región de Cajamarca.

## Conclusiones e implicaciones

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea neonatal en terneros en la región Cajamarca presenta una prevalencia de resistencia múltiple a los fármacos utilizados por los ganaderos en su control, observándose un perfil de resistencia a tetraciclina, sulfametopim, neomicina, y enrofloxacin (TSNE), como resultado a la mala utilización de fármacos que aumentan la presión de selección sobre cepas que fomentan la expresión de genes de virulencia y resistencia a los antibióticos convirtiéndose en focos de transmisión de resistencia tanto para animales como en humanos por la posibilidad de transmisión horizontal entre microorganismos. Considerando que se debería realizar un diagnóstico definitivo, determinado el agente etiológico y la susceptibilidad a los antibióticos, luego aplicar de manera correcta el antibiótico seleccionado en dosis y frecuencia correcta. Además, en base a los resultados obtenidos es necesario determinar los genes de resistencia involucrados en resistencia múltiple a los antibióticos.

### Literatura citada:

1. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2009;(25):13-36.
2. Blanchard PC. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012;(28):443–464. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2012.07.002>.
3. Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;(5):1-12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00023>.
4. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: A multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;(6):383–407. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9235-z>.
5. Mcewen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 2002;(34):3:S93-S106.
6. Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z, Zhang L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 2021;(3):32–38. <https://doi.org/10.1016/J.BSHEAL.2020.09.004>.
7. Jarrige N, Cazeau G, Bosquet G, Bastien J, Benoit F, Gay E. Effects of antimicrobial exposure on the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in the digestive flora of dairy calves. *Prev Vet Med* 2020;(185):105177. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105177>.

8. Gharieb R, Fawzi E, Elsohaby I. Antibiogram, virulotyping and genetic diversity of *Escherichia coli* and Salmonella serovars isolated from diarrheic calves and calf handlers. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* 2019;(67):101367. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101367>.
9. Louge-Uriarte EL, González-Pasayo RA, Massó M, Carrera-Paez L, Domínguez-Moncla M, Donis N, *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* of the phylogroups A and C in dairy calves with meningitis and septicemia. *Microbial Pathogenesis* 2022;(163):105378. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.105378>.
10. Resapath A. French surveillance network for antimicrobial resistance in pathogenic bacteria of animal origin. ANSES. 2018.
11. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Suppl. Wayne, PA: 2006.
12. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;181(1):261-72. <https://doi.org/dqjh6j>.
13. Konno, T; Yatsuyanagi, J; Takahashi, S; Kumagai, Y. Isolation and identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis. *Jpn J Infect Dis* 2012;65:203-207. <https://doi.org/f3zvj5>.
14. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). The User's Guide for EUCAST and CLSI-potency Neo-Sensitabs™. <http://pishrotashkhis.com/wp-content/uploads/2017/07/Neo-SENSITAB-CLSI-EUCAST-Potency.pdf>.
15. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 2013;25(12):6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235. PMID: 24287850; PMCID: PMC3881111.
16. Astorga F, Navarrete-Talloni MJ, Miró MP, Bravo V, Toro M, Blondel CJ, Hervé-Claude LP. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from dairy calves and bedding material. *Heliyon* 2019;26:(11):e02773. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02773. PMID: 31844709; PMCID: PMC6888714.
17. Berge AC, Moore DA, Sisco 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):3872-8. doi: 10.1128/AEM.02239-05. PMID: 16751491; PMCID: PMC1489621.
18. Constable PD. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J Vet Intern Med* 2004;18(1):8-17. doi:10.1892/0891-6640(2004)18<8:auitto>2.0.co;2.

19. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Vet Scand* 2013;9:55(1):49. doi:10.1186/1751-0147-55-49. PMID: 23837498; PMCID: PMC3720286.
20. Brunton LA, Duncan D, Coldham NG, Snow LC, Jones JR. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet Rec* 2012;22:171(12):296. doi:10.1136/vr.100924.
21. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J Dairy Sci* 2015;98(1):500-16. doi:10.3168/jds.2014-8432.
22. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001;32(3-4):227-41. doi:10.1051/vetres:2001121.
23. Sunde M, Fossum K, Solberg A, Sørum H. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 1998;4(4):289-99. doi:10.1089/mdr.1998.4.289.
24. Liu J, Yu F, Call DR, Mills DA, Zhang A, Zhao Z. On-farm soil resistome is modified after treating dairy calves with the antibiotic florfenicol 2015;750:141694. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141694.
25. Ferroni L, Albin E, Lovito C, Blasi F, Maresca C, Massacci FR, *et al.* Antibiotic consumption is a major driver of antibiotic resistance in calves raised on Italian cow-calf beef farms. *Res Vet Sci* 2022;145:71-81. doi:10.1016/j.rvsc.2022.01.010.
26. Rigobelo EC, Gamez HJ, Marin JM, Macedo C, Ambrosin JA, Ávila FA. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isolada de bezerros com diarreia *Vet Medicine • Arq. Bras Med Vet Zootec* 2006;58(3) <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000300003>.
27. Gow SP, Waldner CL, Rajić 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.
28. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, *et al.* Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(2):576-81. doi:10.1128/AEM.68.2.576-581.2002.
29. Barour D, Berghiche A, Boulebda N. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria. *Vet World* 2019;12(8):1195-1203. doi:10.14202/vetworld.2019.1195-1203.

30. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* O157 aislada de humanos, bovinos, porcinos y alimentos. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(2):576-81. doi:10.1128/AEM.68.2.576-581.2002.
31. Barour D, Berghiche A, Boulebda N. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria. *Vet World* 2019;12(8):1195-1203. doi:10.14202/vetworld.2019.1195-1203.
32. Formenti N, Martinelli C, Vitale N, Giovannini S, Salogni C, Tonni M, *et al.* Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in dairy calves: a 15-year retrospective analysis and comparison of treated and untreated animals. *Animals (Basel)* 2021;11(8):2328. doi:10.3390/ani11082328.
33. Watts RE, Totsika M, Challinor VL, Mabbett AN, Ulett GC, Voss JJ, De Schembri MA. Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2012;80(1):333–344. <https://doi.org/10.1128/IAI.05594-11>.
34. Su Q, Guan T, Lv H. Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine. *Scientific Reports* 2016;6(1):24099. <https://doi.org/10.1038/srep24099>.
35. Subashchandrabose S, Mobley H LT. Host –Pathogen Interface 80 during urinary tract infection. *Metallomics* 2015;7(6):935–942. <https://doi.org/10.1039/C4MT00329B>.
36. Jia Y, Mao W, Liu B, Zhang S, Cao J, Xu X. Study on the drug resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance genes. *Front Microbiol* 2022;3:992111. doi:10.3389/fmicb.2022.992111.
37. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(16):5560-6. doi:10.1128/AEM.01511-15.