UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

POSTGRADOS ACADÉMICOS Y ESPECIALIZACIONES

Salmonella enterica en terneros lecheros de Uruguay: su rol como causal de enfermedad y mortalidad, caracterización de serotipos y resistencia a antibióticos

MARÍA LAURA CASAUX

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2018

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

POSTGRADOS ACADÉMICOS Y ESPECIALIZACIONES

Salmonella enterica en terneros lecheros de Uruguay: su rol como causal de enfermedad y mortalidad, caracterización de serotipos y resistencia a antibióticos

MARÍA LAURA CASAUX

Martín Fraga

Lic. en Bioquímica, Magíster en Biotecnología, Dr. en Ciencias Biológicas, Microbiología.

Director de tesis

Federico Giannitti

Vet., Especialista en Salud Animal, Especialista en Diagnóstico Anatomohistopatológico Veterinario.

Codirector de tesis

2018

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Presidente: PhD. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Uruguay

Segundo miembro: PhD. Lucía Yim

Facultad de Medicina- Universidad de La República

Instituto de Higiene

Uruguay

Tercer miembro: PhD. Luís Corbellini

Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva

Faculdade de Veterinária,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Brasil

2018

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

FVET Facultad de Veterinaria Universidad de la República Uruguay
Programa de Posgrados

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

"SALMONELLA ENTÉRICA EN TERNEROS LECHEROS DE URUGUAY: SU ROL COMO CAUSAL DE ENFERMEDAD Y MORTALIDAD, CARACTERIZACIÓN DE SEROTIPOS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS"

Por: Magíster MARÍA LAURA CASAUX

Director de Tesis: **Dr. Martín Fraga**
Codirector de Tesis : **Dr. Federico Giannitti**

Tribunal

Presidente: **Dr. Pablo Zunino**

Segundo Miembro: **Dra. Lucía Yim**

Tercer Miembro: **Dr. Luis Corbellini**

Fallo del Tribunal: APROBADA CON MENCIÓN

Salón de Posgrados, 3 de julio de 2018

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Salón de Posgrado, 3 de julio de 2018

TRIBUNAL: Dr. Pablo Zunino (Presidente), Dra. Lucía Yim, Dr. Luis Corbellini

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
6.196.825-6	CASAUX, MARÍA LAURA	555	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL	FIRMA
Dr. Pablo Zunino (Presidente)	
Dra. Lucía Yim	
Dr. Luis Corbellini	

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Defensa de Tesis pueden ser: 888-6 o 8S8-12

AGRADECIMIENTOS

A Martín Fraga, Federico Giannitti y Franklin Riet Correa por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y formar parte de la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA).

A todos mis compañeros y amigos de la PSA, estudiantes de posgrado y técnicos, sin ellos no hubiera sido posible este trabajo.

A INIA y ANII por el apoyo económico y a Facultad de Veterinaria por permitirme formar parte del programa de posgrado.

A los veterinarios que derivaron los casos clínicos para lograr este estudio.

Al personal del Instituto de Higiene, donde se realizó la serotipificación de los aislamientos.

A todos los estudiantes de la PSA, compañeros y amigos, que participaron en la realización del muestreo.

A mi familia, Diego, Soledad, Carol, Melissa, Yisell, Ana y Carlos que me acompañaron en todo momento.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 11

2. SUMMARY 12

3. INTRODUCCIÓN 14

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS 17

5. HIPÓTESIS 17

6. OBJETIVOS 18

6.1. OBJETIVO GENERAL 18
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES 18

7. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN 18

8. MATERIALES Y MÉTODOS 20

8.1. ESTUDIO I: DIARREA NEONATAL, CASOS Y CONTROLES 20
8.1.1. Determinación del tamaño de muestra y criterio de inclusión 20
8.1.2. Toma de muestras de materia fecal y registro de su grado de fluidez 20
8.1.3. Examen clínico 21
8.1.4. Cuestionario 21
8.1.5. Análisis estadístico 22
8.2. ESTUDIO II: CASOS EN SERIE DE MORTALIDAD DE TERNEROS 22
8.2.1. Selección de casos y necropsias 22
8.2.2. Procesamiento de los órganos para histopatología 23
8.3. PROCESAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS FECALES Y ÓRGANOS 23
8.4. PCR PARA DETECTAR EL GEN *INV*A 24
8.5. SEROTIPIFICACIÓN 25
8.6. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA 25

9. RESULTADOS 27

9.1. ESTUDIO I 27
9.1.1. Descripción de los establecimientos analizados 27
9.1.2. Registro de la encuesta o de la visita 29
9.1.3. Aislamientos de S. enterica de materia fecal 29
9.1.4. Serovariedades de S. enterica aisladas de materia fecal 30
9.1.5. Susceptibilidad antimicrobiana de S. enterica aisladas de materia fecal 31
9.1.6. Identificación de parámetros clínicos asociados a la infección neonatal por S. enterica 33
9.2. ESTUDIO II 34
9.2.1. Detección de S. enterica en casos de mortalidad de terneros 34
9.2.2. Serotipificación 37
9.2.3. Descripción geográfica y clínica de los casos de mortalidad 37
9.2.4 Lesiones macroscópicas halladas en órganos de terneros con salmonelosis 39
9.2.5. Lesiones microscópicas halladas en órganos de terneros con salmonelosis 43
9.2.6. Susceptibilidad antimicrobiana de S. enterica aislada de órganos y contenido intestinal de casos de mortalidad de terneros 48

10. DISCUSIÓN 50

11. CONCLUSIONES 56

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

ANEXO I. CUESTIONARIO SOBRE DATOS GENERALES DEL ESTABLECIMIENTO, DATOS RELACIONADOS A LA CRIANZA Y DATOS SANITARIOS. 68

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Escala en grados de parámetros clínicos evaluados en terneros con y sin diarrea neonatal. 21
Tabla II. Antibióticos utilizados para la prueba de susceptibilidad. 26
Tabla III. Distribución de las muestras de materia fecal según la edad (semanas de vida) y presencia o ausencia de diarrea en los terneros muestreados. 27
Tabla IV. Antibióticos utilizados en tratamientos de diarreas neonatales en terneros de 23 establecimientos muestreados y encuestados. 28
Tabla V. Datos generales del manejo del preparto y la crianza en los establecimientos muestreados. 29
Tabla VI. Distribución de serotipos de *S. enterica* aisladas de heces de terneros, según semanas de vida. 30
Tabla VII. Distribución de aislamientos de *Salmonella enterica* según tambos y categorización de las heces de terneros. 31
Tabla VIII. Perfiles fenótipicos de resistencia en 22 aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de heces. 32
Tabla IX. Caracterización de los patrones de resistencia hallados en 20 aislamientos de *Salmonella enterica* con multirresistencia obtenidos de materia fecal. 32
Tabla X. Asociación entre los parámetros clínicos y la infección por *S. enterica*. 33
Tabla XI. Aislamientos obtenidos a partir del Estudio I y su serotipo correspondiente.. 34
Tabla XII. Serotipos de *Salmonella enterica* aislados a partir de órganos/fluidos corporales en 19 terneros necropsiados. 36
Tabla XIII. Motivo de consulta, morbilidad y mortalidad en 12 brotes de mortalidad de terneros por salmonelosis. 39
Tabla XIV. Lesiones macroscópicas detectadas en 17 terneros necropsiados con salmonelosis. 41
Tabla XV. Lesiones histológicas detectadas en 17 terneros necropsiados con salmonelosis. 47
Tabla XVI. Muestra de origen de los aislamientos de *S. enterica* seleccionados de cada brote y caso de mortalidad de terneros. 48
Tabla XVII. Caracterización de los patrones de resistencia a antibióticos hallados en aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de órganos o contenido intestinal de terneros necropsiados. 49

Figura 1. Departamentos en los cuales se realizó el muestreo del Estudio I. 27
Figura 2. Departamentos en donde se detectaron 12 brotes de mortalidad de terneros por *Salmonella enterica*. 37
Figura 3. Principales motivos de consulta en 12 brotes de mortalidad de terneros por *S.* enterica. 38
Figura 4. Ternero A, brote K. Yeyuno: severa enteritis fibrinosa extensiva/segmental con linfadenomegalia mesentérica. *Salmonella* Typhimurium. 42
Figura 5. Ternero A, brote D. El hígado presenta bordes redondeados (hepatomegalia) y decoloración ocre difusa del parénquima (colestasis), la superficie de corte (abajo)

presenta numerosos focos coalescentes diseminados pálidos de bordes poco demarcados, de aproximadamente 1 mm (hepatitis). *Salmonella* Typhimurium..... 42
Figura 6. Ternero A, brote J. La glándula adrenal del lado izquierdo de la foto presenta extensa hemorragia cortical, que no se aprecia en la glándula adrenal del lado derecho de la imagen. *Salmonella* Dublin. 43
Figura 7. Ternero A, brote J. El bazo, in situ, se presenta difusamente agrandado (esplenomegalia), se aprecia además decoloración amarillenta del tejido adiposo mesentérico y subcutáneo (ictericia). *Salmonella* Dublin. 43
Figura 8. Ternero A, brote A. Se aprecia abundante exudado fibrinoso y supurativo/neutrofílico con restos celulares necróticos adherido a la superficie luminal del colon, formando una seudomembrana (arriba). La lámina propia y submucosa subyacentes se encuentran infiltradas por numerosos neutrófilos. *Salmonella* Typhimurium. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina. .. 44
Figura 9. Ternero B, brote J. Una cripta colónica (centro) se encuentra dilatada, delimitada por epitelio atenuado y contiene restos de enterocitos necróticos y neutrófilos (criptitis). *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina. 44
Figura 10. Ternero B, brote J. Hepatitis necrotizante, fibrinosa y neutrofílica severa aguda. *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina. . 45
Figura 11. Ternero B, brote J. Pulmón. Los septos alveolares se encuentran expandidos e infiltrados por numerosos neutrófilos y macrófagos, se aprecia además exudado fibrinoso en la luz de un alvéolo (abajo, derecha). *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina. 45
Figura 12. Ternero A, brote J. Foco de esplenitis fibrinosa, necrotizante y neutrofílica en la pulpa roja. *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina. 46

1. RESUMEN

Salmonella enterica es un patógeno zoonótico distribuido mundialmente, con importantes efectos negativos en salud animal y pública. En Uruguay, la actividad agropecuaria es central en la economía. La salmonelosis bovina puede producir importantes pérdidas para la ganadería, y los bovinos actuar como fuente de infección humana y reservorio de cepas con resistencia antibiótica. En este trabajo se evaluó la asociación entre la infección por *Salmonella enterica* y el síndrome de diarrea neonatal bovina, los factores asociados a la infección y la mortalidad de terneros en tambos de Uruguay. Además, se determinó el serotipo y perfil de sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos. Se evaluaron clínicamente y se tomaron muestras de heces de 544 terneros de 1 a 30 días de edad, incluyendo 262 terneros con y 282 terneros sin diarrea, en un total de 30 tambos (estudio I). A su vez, se analizaron por bacteriología e histopatología muestras de tejidos y/o fluidos corporales de terneros necropsiados procesados en la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela, para determinar la causa de muerte (estudio II). En el estudio I se aisló *S. enterica* en 22 (4,04%) muestras de heces de terneros que pertenecían a 9/30 establecimientos (30%). A su vez, en el estudio II, se aisló *S. enterica* en 19 casos de 12 brotes de mortalidad de terneros y se vinculó el aislamiento con los hallazgos patológicos macro y/o microscópicos, que fueron típicos de salmonelosis. *Salmonella* Typhimurium fue el serotipo más frecuentemente aislado de heces (19 aislamientos, 86,4%), seguido de *S.* Anatum (3 aislamientos, 13,6%), en el estudio I. En 10 de los 12 brotes de mortalidad estudiados (estudio II) se detectó el serotipo *S.* Typhimurium (83,3%), mientras que *S.* Dublin se detectó en los restantes 2 (16,7%). En el estudio I hubo asociación estadísticamente significativa entre la infección y varios parámetros clínicos, entre los que se destacaron: actitud anormal, reducción del reflejo de succión y capacidad de incorporación de los terneros, presencia de fibrina en las heces y fiebre. Del panel de 15 antibióticos evaluados, los aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de ambos estudios presentaron mayor frecuencia de resistencia frente a estreptomicina (38/41), tetraciclinas (36/41) y ciprofloxacina (15/41), y todos fueron sensibles a fosfomicina. La presencia de aislamientos multirresistentes fue frecuente (34/41 aislamientos evaluados, 82,9%), encontrándose aislamientos con sensibilidad disminuida frente hasta seis grupos de antibióticos. Se concluye que *S. enterica* está asociada a enfermedad neonatal y mortalidad de terneros en establecimientos lecheros de Uruguay, que *S.* Typhimurium es el serotipo encontrado con mayor frecuencia, y que hay cepas de *Salmonella enterica* de origen bovino que presentan resistencia/multirresistencia a antibióticos. El diagnóstico clínico, patológico y bacteriológico de salmonelosis representa la base para comprender la epidemiología de esta enfermedad, implementar medidas preventivas y

terapéuticas, como así también estudiar en profundidad las características microbiológicas de las cepas circulantes en el país.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, diarrea neonatal bovina, mortalidad de terneros, resistencia a antibióticos, producción lechera, salud animal, enfermedades infecciosas, salmonelosis.

2. SUMMARY

Salmonella enterica is a zoonotic pathogen of worldwide distribution, with important effects on animal and public health. Livestock farming is central to the economy of Uruguay. Bovine salmonellosis can cause important economic losses to the livestock industry, and cattle can serve as source of human infections, and reservoirs of *Salmonella* strains with antibiotic resistance. In this work, we assessed the association between *Salmonella enterica* infection and neonatal calf diarrhea syndrome, factors associated with the infection, and calves´ mortality in dairy farms in Uruguay. Additionally, the *Salmonella enterica* serotypes infecting cattle and their antibiotic sensitivity profile were determined. A total of 544 neonate dairy calves from 1 to 30 days of age from 30 dairy farms, including 262 calves with diarrhea and 282 calves without diarrhea, were clinically evaluated, and individual fecal samples were collected (study I). Furthermore, samples of tissues and/or body fluids obtained from necropsied calves were processed at INIA La Estanzuela Animal Health Platform for histopathology and/or bacteriology to investigate the cause of death (study II). In study I, *S. enterica* was isolated from 22 (4.04%) fecal samples from calves from 9 (30%) farms. In study II, *S. enterica* was isolated in 19 cases in 12 spontaneous outbreaks of calf mortality, and the isolation was linked to the gross and/or microscopic pathological findings in the necropsied calves, that were typical of salmonellosis. *Salmonella* Typhimurium was the most frequent serotype isolated from feces (19 isolates, 86.4%), followed by *S.* Anatum (3 isolates, 13.6%) in study I. In 10 of the 12 mortality outbreaks studied (study II), *S.* Typhimurium was detected (83.3%), while *S.* Dublin was found in the remaining 2 (16.7%). The factors associated with *Salmonella* infection were determined in study I. There was an association between the infection and several clinical parameters, including abnormal attitude of the calves, abnormal suction reflex, reduced calves´ ability to stand up, presence of fibrin in the feces, and fever. Antibiotic sensitivity testing using a panel of 15 antibiotics, revealed that the *Salmonella enterica* isolates showed higher frequency of resistance to streptomycin (38/41), tetracyclines (36/41) and ciprofloxacin (15/41), while all isolates were sensitive to fosfomycin. Thirty-four of the 41 isolates (82.9%) assayed were resistant to multiple antibiotics (multirresistant strains), with some isolates showing decreased sensitivity to up to six groups of antibiotics. We conclude that

Salmonella enterica is associated with neonatal calf disease and calf mortality in dairy farms in Uruguay, that *S.* Typhimurium is the most frequently isolated serotype, and that there are strains of *Salmonella enterica* of bovine origin that show resistance/multirresistance to antibiotics. The clinical, pathological and bacteriological diagnosis of salmonellosis represents the basis for understanding the epidemiology of this disease, implementing preventive and therapeutic measures, and further studying the microbiological characteristics of *Salmonella* strains in Uruguay.

Key words: *Salmonella enterica*, neonatal calf diarrhea, calf mortality, antibiotic resistance, dairy farming, animal health, infectious diseases, salmonellosis.

3. INTRODUCCIÓN

La lechería bovina representa una importante actividad socioeconómica, ampliamente distribuida en Uruguay, principalmente en las regiones sur y litoral. En 2016 se destinaron a esta actividad 763.000 hectáreas, 4,37% del territorio nacional. La producción láctea cubrió el consumo interno (255 litros/persona) y generó exportaciones por US$ 556.209.000. El mismo año, las existencias de ganado lechero eran de 767.000 cabezas, de las cuales 55.000 fueron terneros (MGAP 2017). Las enfermedades infectocontagiosas del ganado revisten importancia dado que reducen la productividad, aumentan la mortalidad y tienen impacto potencial en la salud pública y seguridad alimentaria (Acha & Szyfres 2003), a la vez que promueven la utilización de antibióticos.

La morbi-mortalidad neonatal en tambos afecta negativamente la eficiencia productiva, particularmente en sistemas intensivos (Lorenz et al. 2011). Múltiples enfermedades pueden afectar a los terneros, causando grandes pérdidas económicas. Entre las más importantes se encuentran aquellas responsables del síndrome de diarrea neonatal (SDN) (Lundborg et al. 2005). Este es un síndrome multifactorial, asociado a agentes infecciosos y parasitarios, deficiencias del calostrado, manejo sanitario, factores inmunológicos, aspectos nutricionales y medioambientales en los sitios de crianza de terneros ("guacheras") (Carvalho et al. 2014; El-Seedya et al. 2016; Lundborg et al. 2005). Entre los agentes infectocontagiosos asociados al SDN se encuentran varios patógenos virales, bacterianos y protozoarios. Estudios recientemente publicados indican que rotavirus grupo A, *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteropatogénica, y *Salmonella enterica* infectan a terneros neonatos con diarrea en rodeos lecheros de Uruguay (Caffarena et al. 2016; Castells et al. 2016; Umpiérrez et al. 2016; Aráoz et al. 2017).

Salmonella es un bacilo gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, que contiene más de 2500 serotipos en 2 especies: *S. enterica* (con 6 subespecies) y *S. bongori* (Agbaje et al. 2011). La infección de especies animales de sangre caliente se debe a varios serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Algunos serotipos individuales tienen predilección por un huésped en particular, pero pueden infectar y eventualmente causar enfermedad en otros. Los serotipos restringidos a huéspedes son Dublin y Cholerasuis, que preferencialmente infectan al bovino y porcino, respectivamente; mientras que otros serotipos como Typhimurium y Enteritidis pueden infectar a una amplia gama de huéspedes, y otros infectan a un rango restringido de especies (por ejemplo, Typhi y Paratyphi al ser humano) (Costa et al. 2012). Si bien varios serotipos pueden infectar al bovino, la salmonelosis en este grupo de animales

predominantemente se debe a *S.* Dublin y *S.* Typhimurium (Sánchez et al. 2012; Cho & Yoon 2014; Uzal et al. 2015).

Múltiples factores afectan la patogénesis de salmonelosis en bovinos, entre ellos, el estado fisiológico del animal, la edad, la inmunidad y la dosis infectiva (Nielsen et al. 2013). La principal vía de infección es fecal-oral, a través de la contaminación de alimentos, leche o calostro, agua y ambiente (Nielsen et al. 2013). La infección se manifiesta en forma de enfermedad entérica, septicémica o en forma asintomática (Uzal et al. 2015). Aunque ambos serotipos (Dublin y Typhimurium) pueden causar enfermedad entérica en bovinos, hay una tendencia por una manifestación clínica diferencial entre ellos. El serotipo Typhimurium generalmente se asocia a enteritis y diarrea aguda en terneros jóvenes, mientras que Dublin a menudo se asocia con infecciones sistémicas que pueden resultar en muerte repentina, cuadros febriles, enfermedad respiratoria, aborto en hembras preñadas, manifestaciones que no necesariamente se asocian a diarrea (Carrique-Mas et al. 2010; Costa et al. 2012), así como también resultar en animales portadores. Estos son eliminadores asintomáticos del patógeno y, por lo tanto, son importantes en la epidemiología de la enfermedad en los rodeos (Uzal et al. 2015). En los bovinos, el serotipo Dublin, además de eliminarse por materia fecal, puede eliminarse por calostro y leche, que suelen representar importantes fuentes de infección para los terneros neonatos (Costa et al. 2012).

Salmonella Dublin es un patógeno adaptado al bovino. En Uruguay, ha sido reportado como causa de septicemia y urocistitis en terneros (Costa et al. 2018). La exposición a alimentos contaminados (principalmente leche y sus derivados) y a animales infectados, puede causar infecciones invasivas y bacteriemia en humanos (Crump et al. 2011; Hoelzer et al. 2011). En Uruguay, existen estudios de caracterización de aislamientos de *Salmonella* Dublin aflagelados aislados de humanos y bovinos, los cuales se caracterizan por ser potencialmente invasivos (Yim et al. 2014; Sasías et al. 2018). La invasividad se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad, y en estos casos resulta necesaria la terapia antibiótica (Harvey et al. 2017). En Estados Unidos, en los últimos años, se observó un incremento en la resistencia y multirresistencia antibiótica presente en este serotipo (Harvey et al. 2017).

El cultivo bacteriológico es la técnica de referencia para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de diferentes orígenes. Sin embargo, esta metodología insume varios días para la identificación definitiva del agente y además posee una sensibilidad relativamente baja (Love & Rostagno 2008; Shanmugasamy et al. 2011; González Pedraza et al. 2014). En las últimas décadas se desarrollaron técnicas más rápidas y precisas de biología molecular con mayor sensibilidad y especificidad (Farfán 2015), que permiten una más rápida detección e identificación de *Salmonella*. Comúnmente se utiliza la amplificación por PCR del gen *invA* para detectar e incluso cuantificar *Salmonella*

spp. (Malorny et al. 2003). Este gen codifica para una proteína implicada en la virulencia de *Salmonella*, que está asociada a la invasión del epitelio intestinal. La amplificación de *invA* mediante PCR es considerada una herramienta importante de diagnóstico, ya que es un componente genético estable y específico de este género bacteriano (Rahn et al. 1992; Chacón et al. 2010).

En producción animal es frecuente la utilización de antimicrobianos, a veces en dosis sub-terapéuticas, lo que fomenta la selección y viabilidad de bacterias resistentes (Holmberg et al. 1984; Alexander et al. 2008). Se ha reportado resistencia en enterobacterias como *Escherichia coli y Salmonella* spp. a algunos grupos de antibióticos, como las quinolonas y los β-lactámicos, que son frecuentemente administrados en bovinos lecheros (Constable et al. 2004; Hur et al. 2012). En los últimos años, la emergencia de cepas resistentes y multirresistentes en seres humanos ha llevado a la pérdida de efectividad de la última generación de antibióticos como los β-lactámicos y las quinolonas, y al uso de fármacos como la colistina, que es utilizada como último recurso terapéutico frente a microorganismos multirresistentes (Paciel et al. 2011). Se ha descrito también la resistencia a esta droga en aislamientos de *Salmonella* spp. y *E. coli* a partir de muestras de animales (Anjum et al. 2016; Kempf et al. 2016).

Existen diferentes criterios para clasificar a los microorganismos multirresistentes a antibióticos. Se consideran multirresistentes aquellas bacterias que presentan resistencia a al menos un compuesto en tres o más clases de antibióticos (Magiorakos et al. 2012). Los genes que codifican para los atributos de resistencia se suelen encontrar en elementos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones, lo que implica un potencial de diseminación, tanto entre bacterias que infectan a los animales como a aquellas que infectan a los seres humanos (Davies & Davies 2010; Sánchez et al. 2012).

Salmonella spp. es uno de los principales agentes implicados en las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), tanto en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo. Cifras de la Organización Mundial de la Salud indican que enferman de ETAs 550 millones de personas anualmente, afectando principalmente a niños (WHO 2017). Los alimentos implicados son diversos. Numerosos brotes están relacionados con la ingesta de huevos y subproductos crudos, vegetales y carne, así como a hábitos de higiene inadecuada (CDC 2018). *Salmonella enterica* está entre las principales bacterias responsables de ETAs a nivel mundial (WHO 2017). El serotipo Typhimurium, seguido por Heidelberg y Enteritidis, fueron los más frecuentemente detectados en muestras de origen animal, alimentos y ambiente a nivel mundial (Galanis et al. 2006). La mayor parte de los estudios en los que se relevaron los serotipos circulantes, tanto en Brasil como en Argentina, corresponden a casos de origen aviar, porcino y casos de enfermedad humana de transmisión alimentaria (Ibar et al. 2009; Da Silva et al. 2014; Quesada et al. 2016). En ambos países, los serotipos más frecuentes en brotes de salmonelosis bovina fueron Typhimurium

y Dublin (Rahn et al. 1992; Pereira et al. 2004; Giannitti et al. 2010; Margineda et al. 2010; Ribeiro et al. 2010), aunque se reportan esporádicamente otros serotipos como Newport (Morrell et al. 2008; Odriozola et al. 2008), Arechabaleta, Livingston y Panama (Bellinzoni et al. 1990).

En este trabajo se determinó la frecuencia de infección por *Salmonella enterica* en terneros con y sin diarrea neonatal, y su rol como patógeno asociado a mortalidad de terneros en tambos de Uruguay. También se se identificaron factores asociados a la infección y se serotipificaron los aislamientos y se caracterizó su perfil de resistencia a antibióticos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La etapa neonatal de los terneros (primeros 30 días de vida) se caracteriza por ser un periodo crítico, durante el cuál pueden presentarse episodios de morbimortalidad y pérdidas por diferentes síndromes. *Salmonella enterica* es uno de los agentes involucrados en el síndrome de diarrea neonatal y/o en septicemias.

En Uruguay no hay datos reportados de incidencia o prevalencia de *Salmonella* spp. en terneros de tambos, aunque hay evidencia de que la salmonelosis bovina está presente en estos sistemas productivos (Dres. Rodolfo Rivero y Edgardo Gianneechini, DILAVE, comunicación personal, 2016). No hay estudios sistemáticos que permitan determinar la frecuencia de infección en terneros de tambos con y sin diarrea, su asociación a enfermedad, patología y muerte de terneros, los serotipos circulantes en bovinos, ni su perfil de resistencia a antibióticos. Tampoco se conoce el rol que los bovinos pudieran tener en la transmisión de la salmonelosis al humano, ni existen caracterizaciones genotípicas extensas de cepas de origen bovino. A pesar de que este estudio no abarcó estos dos últimos puntos, permitió generar un banco de cepas de *Salmonella enterica* de origen bovino que servirá como base para abordar futuros estudios.

5. HIPÓTESIS

La infección por distintos serotipos de *Salmonella enterica* está asociada a diarrea y enfermedad neonatal, enteritis, septicemia y muerte en terneros de tambos de Uruguay, y las cepas de origen bovino presentan resistencia a antibióticos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar la infección por *Salmonella enterica* en brotes de mortalidad de terneros y en brotes de diarrea neonatal bovina en tambos de Uruguay en el periodo 2016-2017, y evaluar los factores asociados a la infección en los brotes de diarrea neonatal.

6.2. Objetivos particulares

1- Determinar la frecuencia de infección entérica por *S. enterica* en terneros neonatos con y sin diarrea en tambos de Uruguay, e identificar factores asociados a la infección neonatal.

2- Determinar si *S. enterica* se asocia a patología y muerte en terneros lecheros de Uruguay.

3- Determinar los serotipos de *S. enterica* circulantes en terneros lecheros.

4- Caracterizar la susceptibilidad a antibióticos de las cepas aisladas.

5- Generar una colección de aislamientos de *S. enterica* de origen bovino.

7. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó siguiendo dos estrategias distintas, cada una de las cuales permitió abordar separadamente los primeros dos objetivos específicos. Para lograr el primer objetivo específico, se llevó adelante un estudio de casos y controles (Estudio I), en el cual se muestrearon heces de 544 terneros neonatos, 262 con diarrea (casos) y 282 sin diarrea neonatal (controles), provenientes de 30 tambos de Uruguay, que estaban padeciendo brotes espontáneos de la enfermedad. Estos tambos eran asesorados por veterinarios, que solicitaron asistencia de la Plataforma de Salud Animal (PSA) de INIA La Estanzuela. Cada ternero fue examinado clínicamente y se registraron individualmente varios parámetros clínicos. Las muestras de heces fueron

sometidas a cultivos bacterianos selectivos con el fin de aislar e identificar *S. enterica* para determinar la frecuencia de infección. Se realizó una encuesta en los establecimientos muestreados para hacer una caracterización general de los sistemas de crianza e identificar posibles factores asociados a la infección por *Salmonella enterica*.

Para abordar el segundo objetivo específico se realizó un estudio de casos en serie (Estudio II). Se realizaron necropsias (autopsias) de terneros que murieron espontáneamente en predios lecheros comerciales, a través de interconsultas por veterinarios de la actividad liberal. Ante la ocurrencia de episodios de mortalidad, el equipo de investigación diagnóstica de la PSA de INIA La Estanzuela visitó los predios afectados, donde se realizaron los exámenes postmortem de los terneros. Durante los mismos, se registraron lesiones macroscópicas, y se recolectaron muestras frescas de heces, tejidos y/o fluidos corporales. Asimismo, se recolectaron muestras de tejidos que se fijaron en formalina para estudios histopatológicos. Las muestras frescas fueron sometidas a cultivos bacterianos selectivos para aislamiento de *S. enterica*. Los resultados de los cultivos fueron analizados en el contexto del estudio patológico, para establecer un diagnóstico etiológico y determinar si las lesiones encontradas eran compatibles con las causadas por *S. enterica*.

Las cepas de *S. enterica* aisladas fueron sometidas a serotipificación y antibiograma para establecer su perfil de resistencia a antibióticos, lo que permitió abordar los objetivos específicos 3 y 4. Se estableció así una colección de cepas de *S. enterica* de origen bovino para futuros estudios, lo que constituye el quinto y último objetivo específico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Estudio I: diarrea neonatal, casos y controles

8.1.1. Determinación del tamaño de muestra y criterio de inclusión

El tamaño de la muestra se calculó en base a un estudio de casos y controles, considerando un nivel de significancia de α=0.05 (valor p<0,05 para un valor significante de "odds ratio" -OR-, razón de chances) y un poder de 85%, con una prevalencia de exposición en los controles de 5% y un OR=2,5. El cálculo se realizó utilizando un calculador de acceso libre

(http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=case-controlSS), arrojando un valor de 538 muestras, 269 casos y 269 controles.

El muestreo, no probabilístico, se realizó en 30 establecimientos lecheros que presentaron brotes de diarrea neonatal y solicitaron asesoramiento técnico a través de sus veterinarios. En cada establecimiento se muestrearon un mínimo de 4 y un máximo de 26 terneros de hasta 30 días de edad. Se procuró la inclusión de aproximadamente 50% de casos y 50% de controles. Las visitas a los establecimientos lecheros para el muestreo fueron realizadas entre los meses de marzo y noviembre de 2016 por veterinarios estudiantes de posgrado de la PSA de INIA La Estanzuela.

8.1.2. Toma de muestras de materia fecal y registro de su grado de fluidez

Para cada ternero se registró la edad al muestreo/examen clínico, el sexo y la paridad de su madre (primípara/multípara). La colecta de materia fecal se realizó individualmente por cada ternero, directamente de la porción terminal del recto/ano, usando guantes y recipientes plásticos estériles descartables. Las muestras se acondicionaron e identificaron, y fueron transportadas refrigeradas al laboratorio de bacteriología de la PSA, dentro de las 12 horas de su recolección. La materia fecal se clasificó subjetivamente al momento del muestreo según su fluidez en 4 grados crecientes (adaptado de McGuirk 2008), siendo considerados controles (sin diarrea) los terneros con los grados 0 y 1, y casos (con diarrea) aquellos con los grados 2 y 3, como se expresa en la Tabla I. Las muestras de heces fueron procesadas bacteriológicamente según la metodología descrita en el punto 8.3.

8.1.3. Examen clínico

Se realizó una revisación clínica individual completa para cada ternero muestreado, registrándose los siguientes parámetros: actitud general, capacidad de incorporación, reflejo de succión, estado del ombligo (diámetro, presencia/ausencia de exudados y dolor a la palpación), y presencia de secreciones nasal y/u ocular, basándose en metodologías previamente descritas (McGuirk 2008; Amaral-Phillips 2012; Cramer & Stanton, 2015; Caffarena 2017). Estos parámetros se clasificaron en grados del 0 al 3, considerando el 0 como normal y los valores 1 a 3, grados crecientes de anormalidad clínica. A los efectos del análisis, los resultados fueron agrupados y dicotomizados en valores normales (0) y anormales (1) tal como se expresa en la Tabla I. La temperatura rectal se evaluó con un termómetro digital (Deltatrack®). Las frecuencias cardíaca y respiratoria se tomaron mediante auscultación de las regiones cardiacas y costales con un estetoscopio, por un periodo de 15 segundos, y se expresaron en frecuencias (número de movimientos) por minuto multiplicando el valor obtenido por 4.

Tabla I. Escala en grados de parámetros clínicos evaluados en terneros con y sin diarrea neonatal.

Grado	Incorporación	Actitud	Reflejo de succión	Descarga nasal	Descarga ocular	Estado del ombligo	Materia Fecal
0	Normal: se para solo sin dificultad y/o con lentitud	Alerta a lento en responder	Presente, fuerte a moderado	Normal, acuosa, mínima a opaca	Normal, acuosa, mínima	≤ 1,5 cm - >1,5 sin dolor	Sólida a semisólida
1	No se para solo, necesita ayuda a no se para con ayuda	Depresivo a postrado	Presente, débil a ausente	Mucosa excesiva a mucopurulenta	Moderada a severa	> 1,5 cm, con dolor y supuración	semilíquida a líquida

Adaptado de McGuirk (2008), Amaral-Phillips (2012), Cramer & Stanton (2015) y Caffarena (2017).

8.1.4. Cuestionario

Se realizó un cuestionario en cada establecimiento. Las preguntas estaban relacionadas con datos generales del establecimiento, características de la crianza artificial, sanidad, alimentación, tratamientos sanitarios y registro de mortalidad durante el año 2016 en la crianza artificial, como se observa en el Anexo I.

El preparto individual era considerado aquel donde las vacas próximas a parir se encontraban separadas de otros animales; el preparto colectivo era aquel donde las madres se encontraban junto con otras vacas próximas a la fecha de parición. El calostrado se clasificó de dos maneras. El calostrado natural implicaba que los terneros mamaban directamente de la ubre de sus madres, y el calostrado artificial, que los terneros recibían el calostro administrado por un operario, mediante mamadera o sonda bucoesofágica. El tipo de guachera se clasificó de 3 maneras. En las guacheras de tipo de individual, los animales se encontraban aislados de otros animales sujetados generalmente por estacas, correderas o corrales individuales. Las guacheras colectivas (grupales) incluían animales que se encontraban alojados en un corral con otros animales. Las guacheras mixtas comprendían los animales que permanecían un periodo de forma individual y luego pasaban a un sistema colectivo.

8.1.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software STATA versión 14. El modelo estadístico ajustado por la edad de los terneros se basó en los resultados dicotómicos de la variable independiente "aislamiento de *S. enterica*" (positivo-negativo), que se muestran la Tabla I.

Se utilizó regresión logística condicional para estimar los OR y cuantificar las asociaciones mediante un análisis bivariado (Wikse et al. 1994; Zar 1999; Hosmer & Lemeshow 2000; Latorre 2004; Younis et al. 2009). Para aceptar el modelo estadístico se utilizó la prueba estadística de Chi2 y se consideraron significativas aquellas asociaciones que tuvieron un valor de $p<0,05$.

8.2. Estudio II: casos en serie de mortalidad de terneros

8.2.1. Selección de casos y necropsias

Dentro del marco del servicio de investigación diagnóstica de la PSA de INIA La Estanzuela, se examinaron patológicamente casos espontáneos de muerte en terneros lecheros en predios comerciales. Los episodios de mortalidad fueron investigados a partir de una solicitud (interconsulta) a través de veterinarios de actividad liberal. Los predios padeciendo de episodios de mortalidad de terneros fueron visitados por veterinarios de la PSA. Durante las visitas a los establecimientos se recolectó información epidemiológica (cantidad de animales totales, cantidad de animales expuestos, cantidad de animales enfermos, cantidad de animales que murieron, cuándo empezó la enfermedad), así como la historia clínica, y características del sistema productivo y manejo

general. Se incluyeron en el estudio episodios de mortalidad registrados entre marzo de 2016 y octubre de 2017.

Se realizaron necropsias y se registraron las lesiones macroscópicas. Se recolectaron muestras para estudios histopatológicos, según se explica en la sección 8.2.2, y para análisis bacteriológico, mediante la técnica descripta en el punto 8.3. Aquellos casos con diagnóstico de salmonelosis basados en los exámenes patológicos y bacteriológicos fueron seleccionados y evaluados para el presente trabajo.

8.2.2. Procesamiento de los órganos para histopatología

Las muestras de órganos obtenidas en las necropsias, menores de 1 cm de espesor, fueron preservadas y fijadas por un mínimo de 48 h en solución de formalina (solución 1:10 de formaldehido al 40% en agua desionizada, v/v) tamponada a pH 7 con fosfato de sodio dibásico (concentración final, 6.5 g/L) y fosfato de sodio monobásico (concentración final, 4 g/L). Luego se realizó la reducción de los tejidos en fragmentos más pequeños de hasta 0,5 cm de espesor, y las muestras fueron procesadas rutinariamente para histología, siguiendo una metodología previamente descrita (Carson & Cappellano, 2015). Brevemente, las muestras de tejidos fueron colocadas en histossettes plásticos, deshidratadas por inmersión en una serie de soluciones de etanol al 95% (5 pasajes de 45-60 min cada uno) y al 100% (1 pasaje de 60 min), y xilol (3 pasajes de 45 min cada uno), en un procesador automático de tejidos por infiltración con vacío (Tissue-Tek VIP Jr., Sakura). Posteriormente fueron incluidos en parafina (Histoplas, Sakura) en el mismo procesador de tejidos, y se confeccionaron bloques de parafina usando una consola de inclusión de tejidos (Tissue-Tek TEC 5, Sakura). Mediante un micrótomo rotatorio manual (Accu-Cut SRM 200, Sakura) fueron seccionadas a 4-5 µm de espesor, colocadas el portaobjetos de vidrio y luego coloreadas con hematoxilina y eosina (Sigma Aldrich) usando un coloreador automático de tejidos (Tissue-Tek Prisma, Sakura). Las láminas coloreadas fueron montadas con cubreobjetos usando un bálsamo para microscopía (Entellan, Merck) y examinadas bajo microscopio óptico (Axio Scope.A1, Carl Zeiss).

8.3. Procesamiento bacteriológico de las muestras fecales y órganos

De cada una de las heces extraídas de terneros del muestreo de diarrea neonatal (estudio I), se tomó aproximadamente 1 gramo de materia fecal. En los casos de necropsia (estudio II) se tomaron aproximadamente 5 gramos de cada órgano. Las muestras fueron sembradas en medio MacConkey (Oxoid, Reino Unido) y en 10 ml de caldo tetrationato (CT, Oxoid, Reino Unido), e incubadas a

37°C durante 24 h en atmósfera aeróbica en una estufa de incubación (Binder®, Alemania). Luego de la incubación se tomaron 100 µl de CT y se sembraron en agar xilosa-lisina-deoxicolato (XLD, Oxoid, Reino Unido). Las placas se incubaron a 37°C por 18-24 h (Hanson et al. 2016). Las colonias transparentes con centro negro, sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* fueron sembradas en agar tripticasa soya (TSA, Oxoid, Reino Unido) por 24 h a 37°C en aerobiosis en estufa de cultivo. Se confirmó el género mediante pruebas bioquímicas por métodos convencionales para detección de enterobacterias: presencia de oxidasa y catalasa, pruebas del agar triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), prueba de citrato de Simmons, prueba de la ureasa, y sulfuro indol motilidad (SIM) (Octavia & Lan 2014). Los aislamientos se conservaron en caldo tripticasa soya (TSB) con 20% de glicerol a -80°C para conformar un cepario de *Salmonella* spp.

8.4. PCR para detectar el gen *inv*A

Con el fin de detectar el gen *inv*A, se realizó la extracción de ADN de un aislamiento obtenido de cada establecimiento utilizando un kit comercial (GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit, Sigma-Aldrich). El ADN extraído se cuantificó con un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) y se conservó a -20°C hasta su utilización. Para la amplificación del gen se utilizaron las condiciones y los *primers* 139 (5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3') y 141 (5'-CTACGCACCGTCAAAGGAACC-3') según Malorny et al. (2003).

La mezcla de reacción (25 µl) contenía 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP, Invitrogen), solución de tampón de PCR 1x, 1,5 mM de cloruro de magnesio, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y 25 ng/µl de muestra de ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (ProFlex PCR System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).

Las reacciones amplificación del fragmento incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C por 1 m, 38 ciclos de 95°C por 30 s; 64°C por 30 s; 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 4 m (Malorny et al. 2003). Para detectar y comprobar la presencia y el tamaño del fragmento deseado (284 pb) se corrieron los productos en un gel de agarosa al 1,5% teñido con un colorante comercial (GoodView™ Acid Nucleic Stain). La observación y registro digital de los geles se realizó utilizando un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Gel BIORAD) y el programa Imagen Lab™ BIORAD. Para comprobar la correcta amplificación del gen *inv*A, se seleccionaron 3 productos de amplificación que se secuenciaron en el servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) utilizando los mismos *primers* con los que se realizó la amplificación (Malorny et al. 2003)

y se compararon con la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) utilizando la herramienta Blastn.

8.5. Serotipificación

Con el fin de determinar las serovariedades de los aislamientos de *Salmonella* obtenidos, se emplearon colonias puras del microorganismo enfrentados a antisueros polivalentes y monovalentes (Thermo Fisher Scientific®, USA). Se utilizó el esquema internacional para la serotipificación de *Salmonella* como base metodológica, así como de interpretación y resultados (Grimont & Weill 2007). Esta metodología se ejecutó en el Servicio de Bacteriología del Instituto de Higiene perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de la República, Uruguay.

8.6. Determinación de la sensibilidad antibiótica

Para determinar la sensibilidad de los aislamientos de *Salmonella enterica* a diferentes antibióticos y evaluar la eficacia frente a un posible tratamiento de los animales, se utilizó el método de difusión en agar según Kirby-Bauer (Bauer et al. 1996). A partir de un cultivo puro de 24 h de crecimiento se seleccionó una colonia que se suspendió en solución fisiológica estéril hasta lograr un inóculo con una turbidez equivalente al tubo de 0,5 en la escala de McFarland (aproximadamente $1,5x10^8$ UFC/ml). Mediante un hisopo estéril embebido en el inóculo, se realizó una siembra en agar Müeller-Hinton (Oxoid™, United Kingdom) cubriendo toda la superficie de la placa. Dentro de los 15 m posteriores a la inoculación de la placa se colocaron los discos de antibióticos (Oxoid™, United Kingdom) a ensayar (Tabla II).

Se midieron los halos de inhibición en mm y se categorizaron e interpretaron los resultados en sensibles, intermedios y resistentes mediante los puntos de corte presentes en la tabla del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) 2015 (Bauer et al. 1996; CLSI 2015a; CLSI 2015b). Los aislamientos fueron considerados multirresistentes cuando presentaron un valor que indicaba sensibilidad intermedia y/o resistencia ante tres o más categorías de antibióticos (Magiorakos et al. 2012). La cepa de referencia utilizada fue *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla II. Antibióticos utilizados para la prueba de susceptibilidad.

Categoría de antibiótico	Antibiótico	Contenido del disco (µg)	Puntos de corte (diámetro en mm)		
			Resistente	Intermedio	Sensible
	Ampicilina (AMP)	10	≤13	14-16	≥17
β-lactámicos	Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	20/10	≤13	14-17	≥18
	Cefotaxima (CTX)	30	≤22	23-25	≥26
Diaminopirimidinas-Sulfamidas	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1.25/27.75	≤10	11-15	≥16
	Ácido nalidíxico (NA)	30	≤13	14-18	≥19
Quinolonas	Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16-20	≥21
	Enrofloxacina (ENR)	5	≤21	17-20	≥16
Fenicoles	Cloranfenicol (C)	30	≤12	13-17	≥18
Aminoglucósidos	Estreptomicina (S)	10	≤11	12-14	≥15
	Gentamicina (CN)	10	≤12	13-14	≥15
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE)	30	≤11	12-14	≥15
Polimixinas	Colistina (CT)	25	≤12	13-15	≥16
	Fosfomicina (FOS)	200	≤12	13-15	≥16
Nitrofuranos	Nitrofurantoína (F)	300	≤14	15-16	≥17
Macrólidos	Azitromicina (AZM)	30	≤12	-	≥13

9. RESULTADOS

9.1. Estudio I

9.1.1. Descripción de los establecimientos analizados

Entre el periodo de marzo a setiembre de 2016 se visitaron 30 establecimientos lecheros distribuidos entre los departamentos de San José, Río Negro, Colonia, Flores, Soriano, Florida y Canelones (Figura 1).

Departamento	Cantidad de establecimientos muestreados
San José	13
Río Negro	7
Colonia	6
Flores	1
Soriano	1
Florida	1
Canelones	1
Total	30

Figura 1. Departamentos en los cuales se realizó el muestreo del Estudio I.

En total se tomaron 544 muestras de materia fecal de terneros, correspondientes a 262 terneros con diarrea y 282 terneros sin diarrea. Estos animales no tenían historial de tratamiento con antibióticos. Las muestras provinieron de terneros de 1 a 30 días de edad. En la Tabla III, se resume la distribución de las muestras según la edad (en semanas de vida), y la categorización en diarreicos o no diarreicos.

Tabla III. Distribución de las muestras de materia fecal según la edad (semanas de vida) y presencia o ausencia de diarrea en los terneros muestreados.

	Con diarrea	Sin diarrea	Total
1° semana	67	79	146
2° semana	150	71	221
3° semana	33	88	121
4° semana	12	44	56
Total	262	282	544

En 23 de los establecimientos se pudo obtener información acerca de la administración de antibióticos a los terneros durante los episodios de diarrea. Los animales enfermos se trataron con al menos un antibiótico luego del muestreo. Los antimicrobianos más utilizados fueron la enrofloxacina, las sulfamidas y las tetraciclinas. Las combinaciones de antibióticos utilizados se resumen en la Tabla IV.

Tabla IV. Antibióticos utilizados en tratamientos de diarreas neonatales en terneros de 23 establecimientos muestreados y encuestados.

Antibiótico	N° de establecimientos
TMS-ENR-OX-	5
ENR	4
TMS-TIL-TILM-TUL	3
TMS-ENR	2
TMS- AMX-CN- ENR-N-FT-FFC	2
TMS-ENR- NEO	2
P-S-ENR-OX-TMS	1
ENR-TE	1
OX	1
ENR-TMS-P-S	1
ENR-CLO	1

TMS: trimethoprim-sulfamethoxazole, ENR: enrofloxacina, OX: oxitetraciclina, TIL: tilosina, TILM: tilmicosina, TUL: tulatromicina, AMX, amoxicilina, CN: gentamicina, N: nitrofurantoína, FT: F-tialilsulfatiazol, FFC: florfenicol, P: penicilina S: estreptomicina, CLO: cloranfenicol

En 2 establecimientos los encuestados declararon que sólo se usaron antibióticos cuando los terneros presentaron fiebre. Frente a la presencia de diarrea, sólo 2 establecimientos implementaban la fluidoterapia. En casos de diarreas leves o como primera línea de tratamiento, en 10 establecimientos se utilizaron formulaciones conteniendo combinaciones de sulfamidas-diaminopirimidinas, mientras que en 3 establecimientos usaron solamente un fármaco, ya sea oxitetraciclina o enrofloxacina. En 15 establecimientos se utilizó más de un grupo de antibióticos. En casos de diarreas moderadas a graves, 8 establecimientos utilizaron enrofloxacina, en 1 establecimiento se administró tulatromicina, mientras que en 2 establecimientos utilizaron enrofloxacina y oxitetraciclina. En 2 establecimientos utilizaron florfenicol en diarreas de mayor gravedad.

En 7 de 9 de los establecimientos donde se obtuvo aislamientos de *Salmonella enterica*, utilizaron como tratamiento sulfamidas en diferentes formulaciones; en 1 enrofloxacina y en 1 oxitetraciclina. En diarreas asociadas con fiebre en los terneros, 2 establecimientos utilizaron gentamicina. En diarreas que no se resolvieron con el tratamiento inicial, 5 establecimientos usaron

enrofloxacina y en 2 esta fue combinada con florfenicol; en 1 establecimiento se usó oxitetraciclina y en 3 predios se usó tilmicocina, tilosina o tulatromicina.

9.1.2. Registro de la encuesta o de la visita

Las preguntas de la encuesta estuvieron enfocadas a obtener datos sobre características productivas del establecimiento, manejo y características del sistema de crianza y preparto, y características sanitarias y epidemiológicas asociadas, como se muestra resumidamente en la Tabla V.

Tabla V. Datos generales del manejo del preparto y la crianza en los establecimientos muestreados.

Variable	Observaciones		Total de establecimientos
Tipo de preparto	Individual	0	30
	Colectivo	30	
Tipo de guachera	Individual	7	29
	Colectiva	14	
	Mixta	8	
Tipo de calostrado	Natural	14	27
	Artificial	13	
Alimentación de los terneros con leche de descarte	Si	14	29
	No	15	
Rotación de la guachera	Si	6	29
	No	23	
Uso de vacunas para prevención de la diarrea neonatal	Si	12	28
	No	16	
Uso de antibióticos en la guachera	Si	30	30
	No	0	
Tiempo al desmadre	<12 horas	11	28
	12-24 horas	12	
	>24 horas	5	
Aparta los terneros enfermos de los sanos	Si	13	29
	No	16	

9.1.3. Aislamientos de S. enterica de materia fecal

Del total de 544 terneros muestreados, 282 sin diarrea (51,84%) y 262 con diarrea (48,16%), 22 (4,04%) fueron positivos al cultivo de *S. enterica.* Dieciseis (6,1%) de estos animales positivos al cultivo presentaban diarrea, mientras que 6 (2,1%) no presentaban diarrea al momento del muestreo (Tabla VII). Todos los aislamientos mostraron reacciones bioquímicas típicas del género: fueron

positivos a las pruebas de la catalasa, fermentación de la glucosa, descarboxilación de la lisina, producción de sulfuro de hidrógeno, y movilidad, y dieron resultados negativos a las pruebas de ureasa, triptófano, oxidasa, y fermentaron la lactosa y la sacarosa. Veinte aislamientos fueron positivos y 2 fueron negativos a la prueba de citrato de Simmons. Los aislamientos seleccionados de cada establecimiento del muestreo de diarrea neonatal (estudio I) y de cada brote de mortalidad (estudio II), amplificaron un tamaño de banda concordante con el gen *invA* (284 pb), mediante la técnica de PCR.

9.1.4. Serovariedades de S. enterica aisladas de materia fecal

A partir de la materia fecal de 19 terneros se aisló *S.* Typhimurium lo que representó el 86,4% (19/22) de los aislamientos (Tabla VI). Los terneros que dieron origen a estos aislamientos estaban distribuidos en 8 establecimientos de 4 departamentos (Colonia, Canelones, Río Negro y San José). El 13,6% de los aislamientos (3/22) eran *S.* Anatum, todos ellos aislados de terneros pertenecientes a un único establecimiento en el departamento de Colonia.

Tabla VI. Distribución de serotipos de *S. enterica* aisladas de heces de terneros, según semanas de vida.

Semana de vida	*S.* Typhimurium	*S.* Anatum
1	7	0
2	6	2
3	4	1
4	2	0
Total	19	3

Los animales positivos pertenecían a 9 de los 30 establecimientos visitados, lo que representó un 30% de los predios incluidos en este estudio (Tabla VII).

Tabla VII. Distribución de aislamientos de *Salmonella enterica* según tambos y categorización de las heces de terneros.

Tambo	N° de terneros con aislamiento de *Salmonella*/terneros muestreados	N° de terneros con diarrea positivos a *Salmonella*/terneros muestreados con diarrea	N° de terneros sin diarrea positivos a *Salmonella*/terneros muestreados sin diarrea
1	2/15	2/7	0/8
2	2/6	2/3	0/3
3	8/20	5/10	3/10
4	3/11	1/4	2/7
5	1/11	1/7	0/4
6	2/8	2/5	0/3
7	1/11	1/6	0/5
8	2/2	2/2	0/0
9	1/4	0/0	1/4
Total	22/88	16/44	6/44

9.1.5. Susceptibilidad antimicrobiana de S. enterica aisladas de materia fecal

Veintidós aislamientos de materia fecal provenientes de 22 terneros se evaluaron para determinar la susceptibilidad a antibióticos y fueron resistentes a por lo menos un antibiótico (Tabla VIII).

La mayor frecuencia de resistencia se presentó frente a tetraciclinas, con 20 (90,9%) de los aislamientos analizados, seguida de estreptomicina (19, 86,4% de los aislamientos) y ampicilina (5, 22,7%). Se detectó sensibilidad intermedia frente a ciprofloxacina en el 72,7% (16) de los aislamientos y a colistina en el 27,3% (6). Todos los aislamientos fueron sensibles a fosfomicina.

Por otro lado, 20/22 (90,9%) aislamientos de materia fecal fueron multirresistentes, presentando además amplia diversidad en sus fenotipos de resistencia. Los aislamientos presentaron resistencia o sensibilidad intermedia frente a 3, 4, 5 o 6 categorías de antibióticos, predominando el patrón de resistencia a las tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas, con 8 aislamientos cada uno (Tabla IX).

Tabla VIII. Perfiles fenótipicos de resistencia en 22 aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de heces.

	Categoría de sensibilidad antibiótica (% de aislamientos)		
Antibiótico*	**Sensibles**	**Intermedios**	**Resistentes**
AMP	77,2	0	22,7
AMC	86,3	4	9
CTX	86,3	4,5	9
SXT	90.9	0	9
AN	81,8	9	9
CIP	22,7	72,7	4,5
ENR	86,3	4,5	9
C	95,4	4,5	0
S	4,5	9	86,3
CN	95,4	4,5	0
TE	9	0	90,9
CT	72,7	27,2	0
FOS	100	0	0
F	90,9	9	0
AZM	95,4	0	4,54

*AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CTX: cefotaxima, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, AN: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, C: cloranfenicol, S: estreptomicina, CN: gentamicina, TE: tetraciclina, CT: colistina, FOS: fofomicina, F: nitrofurantoína, AZM: azitromicina.

Tabla IX. Caracterización de los patrones de resistencia hallados en 20 aislamientos de *Salmonella enterica* con multirresistencia obtenidos de materia fecal.

Cantidad de grupos de antibióticos frente a los cuales hubo resistencia	**N° de aislamientos de *Salmonella enterica***	**Patrones de resistencia***
3	5	CIP-S-TE
	1	CIP-S-CT
	1	AMP-S-TE
	3	NA-CIP-ENR-TE-S
4	1	CIP-S-TE-AZM
	1	CIP-C-TE-S
	1	CIP-S-CN-TE-CT
	1	CIP-S-C-TE-CT
	1	CTX-NA-CIP-TE-S
	1	AMP-CTX-CIP-S-CT
5	1	AMP-TE-S-CT-F
	1	AMP-SXT-CIP-TE-S
	1	AMP-SXT-CIP-TE-CT
6	1	AMP-AMC-SXT-CIP-TE-S-F

Se presentan los aislamientos que poseen diferentes patrones de resistencia *AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CTX: cefotaxima, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, AN: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, C: cloranfenicol, S: estreptomicina, CN: gentamicina, TE: tetraciclina, CT: colistina, FOS: fofomicina, F: nitrofurantoína, AZM: azitromicina

9.1.6. Identificación de parámetros clínicos asociados a la infección neonatal por S. enterica

Se observó que aquellos terneros infectados con *Salmonella enterica* tuvieron más chances de presentar fibrina en las heces (OR 8,05; p<0,05) o fiebre (OR 3,37; p<0,05). Hubo diferencias significativas en el parámetro "actitud del ternero", donde el valor de OR fue de 4,41 (p<0,05) para el grado 1 de esta variable; es decir, los animales infectados con *Salmonella enterica* tuvieron más chances de presentar una actitud lenta (actitud anormal). Para la variable incorporación, el valor de OR fue de 3,44 (p<0,05) y para la variable "reflejo de succión", el OR fue 2,88 (p<0,05). Es decir, los terneros infectados con *Salmonella enterica* tuvieron más chances de manifestar una disminución de la capacidad de incorporación y del reflejo de succión.

No hubo asociaciones estadísticamente significativas entre la infección por *Salmonella enterica* y la presencia de diarrea, onfalitis, descarga nasal y/u ocular, presencia de sangre en las heces, duración del pliegue cutáneo, tiempo de llenado capilar, frecuencias cardíaca y respiratoria (Tabla X).

Tabla X. Asociación entre los parámetros clínicos y la infección por *S. enterica*.

Variable		OR	IC 95%	P valor
Actitud	Grado 0	Referencia[1]		
	Grado 1	4,41	1,711-11,317	0,0021
Incorporación	Grado 0	Referencia		
	Grado 1	3,445	1,309-9,063	0,0122
Reflejo de succión	Grado 0	Referencia		
	Grado 1	2,882	1,160-7,161	0,0226
Fiebre	Grado 0	Referencia		
	Grado 1	3,376	1,366-8,345	0,0084
Presencia de fibrina en las heces	Sin fibrina	Referencia		
	Con fibrina	8,059	2,615-24,832	0,0003

Grado 0: variable normal; grado 1: variable anormal

Los datos de serotipo obtenidos en el Estudio I se resumen en la Tabla XI.

Tabla XI. Aislamientos obtenidos a partir del Estudio I y su serotipo correspondiente.

Aislamiento	Brote	Edad (d)	Caso/control	Serotipo
1	1	15	Caso	*S*. Typhimurium
2	1	9	Caso	*S*. Typhimurium
3	2	16	Caso	*S*. Typhimurium
4	2	15	Caso	*S*. Typhimurium
5	2	9	Control	*S*. Typhimurium
6	2	13	Caso	*S*. Typhimurium
7	2	9	Control	*S*. Typhimurium
8	3	22	Caso	*S*. Typhimurium
9	3	30	Caso	*S*. Typhimurium
10	3	5	Control	*S*. Typhimurium
11	3	6	Caso	*S*. Typhimurium
12	3	6	Control	*S*. Typhimurium
13	3	4	Caso	*S*. Typhimurium
14	4	11	Caso	*S*. Typhimurium
15	5	11	Caso	*S*. Anatum
16	5	14	Caso	*S*. Anatum
17	5	21	Control	*S*. Anatum
18	6	18	Caso	*S*. Typhimurium
19	7	7	Caso	*S*. Typhimurium
20	8	4	Control	*S*. Typhimurium
21	9	8	Caso	*S*. Typhimurium
22	9	7	Caso	*S*. Typhimurium

9.2. Estudio II

9.2.1. Detección de S. enterica en casos de mortalidad de terneros

En el período marzo de 2016 hasta octubre de 2017, se presentaron en la PSA 44 brotes de mortalidad de terneros y se realizó la necropsia a un total de 66 terneros. Se tomaron muestras de órganos, heces y/o fluidos corporales para realizar diferentes análisis de laboratorio, entre ellos, cultivo selectivo de *Salmonella*. En 12 brotes (A-L) que incluyeron 19 terneros, se aisló *S. enterica* de los tejidos procesados y se vinculó el aislamiento con los hallazgos patológicos macro y microscópicos, en al menos un ternero de cada brote (17 terneros en total). Para esta sección del trabajo, se seleccionaron estos 12 brotes de mortalidad, que representaron un 27,3% del total.

En los 19 terneros necropsiados, se tomaron y procesaron mediante técnicas bacteriológicas en total 336 órganos y fluídos corporales y se obtuvieron

69 aislamientos de *Salmonella enterica* determinados por pruebas bioquímicas, como se mencionó anteriormente. Además, todos los aislamientos seleccionados de cada brote de mortalidad presentaron el gen *invA*.

Las muestras obtenidas en las necropsias de las cuales se obtuvo mayor frecuencia de aislamientos fueron linfonódulo mesentérico, hígado, pulmón y contenido intestinal (Tabla XII).

Tabla XII. Serotipos de *Salmonella enterica* aislados a partir de órganos/fluidos corporales en 19 terneros necropsiados.

Brote	Serotipo	Ternero	Edad (días)	Linfonódulo mesentérico	Hígado	Pulmón	Contenido intestinal	Ciego	Bazo	Bilis	Riñón	Íleon	Orina	Vejiga	Líquido cefalorraquídeo	Líquido peritoneal	Linfonódulo mediastínico
A	*S.* Typhimurium	A	14	+	+	+	-	+	+		NP	+	NP	NP	NP	NP	NP
A	*S.* Typhimurium	B	16	+	+	+	-	NP	+	+	NP	+	NP	NP	NP	NP	NP
A	*S.* Typhimurium	C	14	+	+	-	NP	+	-	+	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
A	*S.* Typhimurium	D	16	+	-	-	-	NP	-	-	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
B	*S.* Typhimurium	A	20	+	NP	+	+	NP	NP	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	+
B	*S.* Typhimurium	B	20	+	NP	-	-	NP	NP	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	NP
C	*S.* Typhimurium	A	15	+	+	+	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
D	*S.* Typhimurium	A	5	+	+	+	+	+	NP	-	+	+	-	+	NP	NP	NP
E	*S.* Typhimurium	A	10	+	-	-	-	NP	NP	-	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
F	*S.* Typhimurium	A	45	+	+	NP	+	NP	NP-	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
G	*S.* Typhimurium	A	10	+	+	NP	NP	NP	-	-	NP	-	NP	NP	NP	NP	NP
H	*S.* Typhimurium	A	90	-	NP	-	NP	+	NP	NP	NP	-	NP	NP	NP	NP	-
I	*S.* Typhimurium	A	15	+	-	NP	+	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
J	*S.* Dublin	A	50	+	+	+	+	NP	+	NP	-	NP	+	NP	NP	NP	NP
J	*S.* Dublin	B	50	+	+	+	+	NP	+	+	+	NP	+	NP	+	+	NP
K	*S.* Typhimurium	A	30	-	+	-	NP	NP	NP	-	-	NP	-	NP	NP	NP	NP
K	*S.* Typhimurium	B	30	+	-	-	NP	NP	-	-	+	-	+	NP	-	NP	NP
K	*S.* Typhimurium	C	30	+	-	+	NP	NP	-	-	+	NP	-	NP	NP	NP	NP
L	*S.* Dublin	A	60	+	+	+	-	NP	NP	+	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Total		19		17	11	9	6	4	4	4	4	3	3	1	1	1	1

(+) aislamiento positivo, (-) aislamiento negativo, NP: no procesado.

9.2.2. Serotipificación

En 10 de los 12 brotes de mortalidad estudiados se detectó el serotipo *S.* Typhimurium (83,3%), mientras que *S.* Dublin se detectó en los restantes 2 brotes (16,7%). Las edades de los animales de cada brote se muestran en la Tabla XII.

9.2.3. Descripción geográfica y clínica de los casos de mortalidad

Los tambos que tuvieron brotes de mortalidad con diagnóstico de salmonelosis procedieron en 9 ocasiones del departamento de Colonia, en 2 ocasiones de San José y en 1 ocasión de Río Negro (Figura 2).

El serotipo *S.* Dublin fue detectado en el departamento de Colonia en 2 brotes que pertenecían a diferentes establecimientos próximos a una misma localidad, de diferentes propietarios. Mientras que el serotipo *S.* Typhimurium fue detectado en 7 brotes en el departamento de Colonia, en 2 brotes en el departamento de San José, y en 1 brote en el departamento de Río Negro.

Departamento	Brotes
Colonia	9
San José	2
Río Negro	1
Total	12

Figura 2. Departamentos en donde se detectaron 12 brotes de mortalidad de terneros por *Salmonella enterica*.

El principal motivo de consulta de los brotes (además de la propia muerte) estuvo predominado por diarrea y diarrea con fibrina (7 brotes, A-G), signos respiratorios (1 brote, H) y depresión o tristeza (1 brote, I). En 3 brotes (J, K y L) el motivo de consulta fue la muerte abrupta de terneros sin apreciación de signos clínicos previos (Figura 3).

Motivo de consulta	Cantidad de brotes
Diarrea (Brotes A-G)	7
Signos respiratorios (Brotes H)	1
Depresión (Brotes I)	1
Muerte (Brotes J-L)	3
Total	12

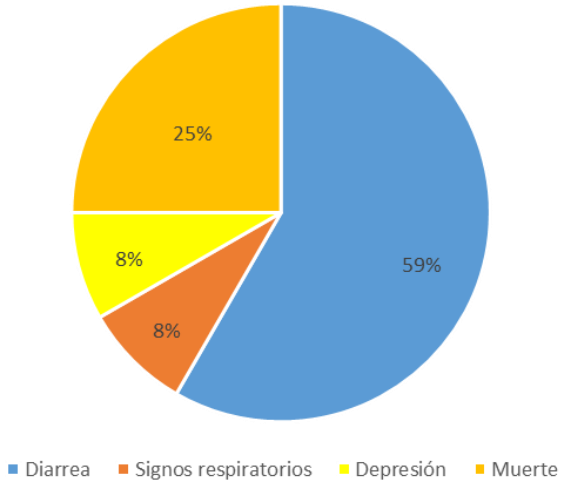

Figura 3. Principales motivos de consulta en 12 brotes de mortalidad de terneros por *S.* enterica.

En los 7 brotes en los que el motivo de consulta fue diarrea, la morbilidad se ubicó entre valores de 10 y 100%, con un promedio de 53,6%. La mortalidad presentó un promedio de 23,6%, con valores de 5,0 a 78,9% (Tabla XIII).

En los brotes donde el serotipo predominante fue *S.* Typhimurium, las edades de los terneros estaban comprendidas entre los 5 y 45 días de vida, excepto en un brote que se presentó a los 90 días de vida.

En el periodo de estudio hubo una sola consulta (brote H) asociada con signos respiratorios. Este establecimiento contaba con 200 terneros, de los cuales se vio afectado el 10% (morbilidad) y la mortalidad fue del 7,5% (15 terneros). Los terneros tenían aproximadamente 3 meses de vida y la evolución de la enfermedad fue de 15 días. El serotipo detectado en este caso fue *S.* Typhimurium.

En un único brote (I) la consulta fue motivada por signos de depresión que terminaban en la muerte. La morbilidad y mortalidad, sobre un lote de 40 animales en este brote, fueron ambas del 12,5%, y se vieron afectados terneros de 15 días de vida. El serotipo detectado fue *S*. Typhimurium.

Tabla XIII. Motivo de consulta, morbilidad y mortalidad en 12 brotes de mortalidad de terneros por salmonelosis.

Motivo de consulta		Serotipo	N° de animales expuestos	N° de animales enfermos	Morbilidad %	N° de animales muertos	Mortalidad %
	Brote A	*S*. Typhimurium	20	2	10,0	2	10,0
	Brote B	*S*. Typhimurium	5	4	80,0	2	40,0
	Brote C	*S*. Typhimurium	26	10	38,5	1	3,8
Diarrea	Brote D	*S*. Typhimurium	41	11	26,8	3	7,3
	Brote E	*S*. Typhimurium	20	4	20,0	1	5,0
	Brote F	*S*. Typhimurium	19	19	100,0	15	78,9
	Brote G	*S*. Typhimurium	5	5	100,0	1	20,0
Signos respiratorios	Brote H	*S*. Typhimurium	200	20	10,0	15	7,5
Depresión	Brote I	*S*. Typhimurium	40	5	12,5	5	12,5
	Brote J	*S*. Typhimurium	147	7	4,8	5	3,4
Muerte	Brote K	*S*. Dublin	50	15	30,0	15	30,0
	Brote L	*S*. Dublin	100	20	20,0	20	20,0

Por último, en 3 ocasiones (brotes J, K y L) el motivo de consulta fue muerte repentina. En los brotes J y K, la presentación fue de forma súbita. Para el brote J, sobre un total de 147 terneros, la morbilidad fue de 4,8% y la mortalidad de 3,4%. Para el brote K, sobre un total de 50 animales, la morbilidad y la mortalidad fueron ambas del 30 %. Para el brote L, ambos valores, morbilidad y mortalidad, fueron del 20% sobre un lote de 100 animales. La edad de los animales afectados estuvo comprendida entre los 30 y 60 días, con un promedio de 46,6 días. En los casos K y L se detectó el serotipo *S.* Dublin, mientras que en el J se encontró *S.* Typhimurium.

Los animales afectados en los 12 distintos brotes tuvieron edades comprendidas entre 1 y 90 días de vida. En 7 brotes, la muerte se presentó entre el día 1 y 20 de vida.

9.2.4 Lesiones macroscópicas halladas en órganos de terneros con salmonelosis

En los 19 animales con salmonelosis necropsiados, sólo se contó con descripciones patológicas macroscópicas en 16 casos. En estos se detectaron lesiones entéricas macroscópicas en 10/16 (Fig. 4), lesiones hepáticas en 5/16 (Fig.5), hemorragias adrenales corticales en 6/13 (Fig. 6), neumonía intersticial en 4/15, linfadenomegalia (Fig. 4) y/o linfadenitis fibrinosupurativa en

linfonódulos mesentéricos en 7/9, esplenomegalia en 4/15 (Fig. 7), abomasitis erosiva/ulcerativa o edema abomasal en 3/15, rumenitis en 1/14, petequias en la mucosa de la vejiga urinaria en 2/13, y serositis/artritis fibrinosa o petequias en las serosas en 10/16. No se apreciaron lesiones miocárdicas en 16/16 animales, renales en 13/13, ni cerebrales en 15/15. Estos resultados se resumen en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Lesiones macroscópicas detectadas en 17 terneros necropsiados con salmonelosis.

Brote	Identificación del animal, serotipo aislado	Enteritis*	Hepatitis	Hemorragia adrenal cortical	Pulmón ***	Linfonódulo mesentérico ****	Esplenomegalia	Abomaso *****	Pre-estómagos (rumenitis)	Corazón (miocardio)	Vejiga (petequias en la mucosa)	Serositis o artritis ******	Riñón	Cerebro
A	A, ST	+	+, A-B-C	+	+	+, B	-	-	-	-	-	+, B	-	-
	B, ST	+	+, A-B	+	-	NR	-	-	-	-	-	+, A	-	-
B	A, ST	-	-	+	+	NR	+	-	-	-	NR	+, C	NR	-
	B, ST	+	-	NR	-	NR	-	+, A	-	-	NR	+, C	NR	-
C	A, ST	-	-	NR	NR	+, A	-	-	+	-	-	-	-	-
D	A, ST	+	+, A-B-C-D	-	+	+, A	+	-	-	-	+	+, E	-	-
E	A, ST	+	-	-	-	+, A	-	-	-	-	-	-	-	-
F	A, ST	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	A, ST	+	+, B	-	-	+, A	+	+, B	NR	-	-	+, B	-	-
H	A, ST	+	-	NR	-	+, A	-	-	NR	-	-	-	NR	NR
I	A, ST	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	+, E	-	-
J	A, SD	-	-	+	-	NR	+	-	-	-	NR	+, E	-	-
	B, SD	-	+, B-C-D	+	-	+, A	-	NR	-	-	+	+, B	-	-
K	A, ST	+	-	+	-	NR	-	+, B	-	-	-	-	-	-
	B, ST	+	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
	C, ST	+	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
L	A, SD	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+, E	-	-

* Incluye enteritis, colitis, tiflitis o combinaciones (enterocolitis, enterotiflitis, tiflocolitis o enterotiflocolitis) fibrinosa, erosiva/ulcerativa.
** Incluye hepatomegalia (A) con o sin decoloración ocre/amarillenta difusa del parénquima (colestasis, B), con o sin hepatitis multifocal diseminada (C), con o sin colecistitis fibrinosa (D).
*** Incluye neumonía intersticial embólica multifocal diseminada.
**** Incluye linfadenomegalia (A) y/o linfadenitis fibrinosupurativa (B).
***** Incluye abomasitis ulcerativa (A) o edema abomasal (B).
****** Incluye artritis fibrinosa (A), peritonitis fibrinosa (B), pericarditis fibrinosa (C), pleuritis fibrinosa (D), petequias en serosas (E).
NR: no reportado.
ST: *Salmonella* Typhimurium.
SD: *Salmonella* Dublin

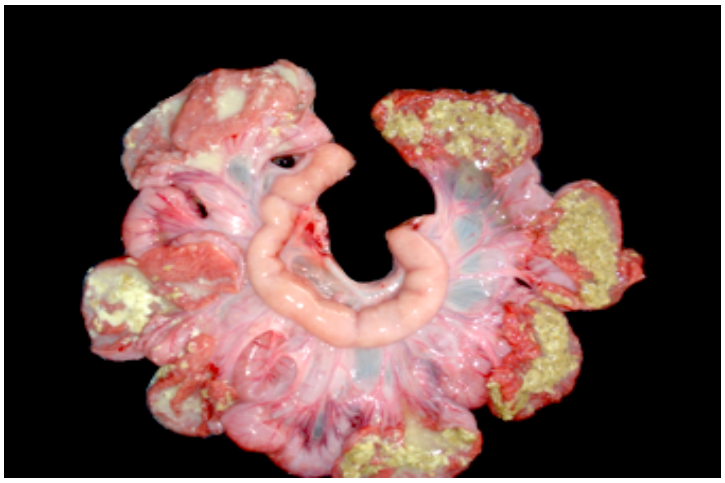

Figura 4. Ternero A, brote K. Yeyuno: severa enteritis fibrinosa extensiva/segmental con linfadenomegalia mesentérica. *Salmonella* Typhimurium.

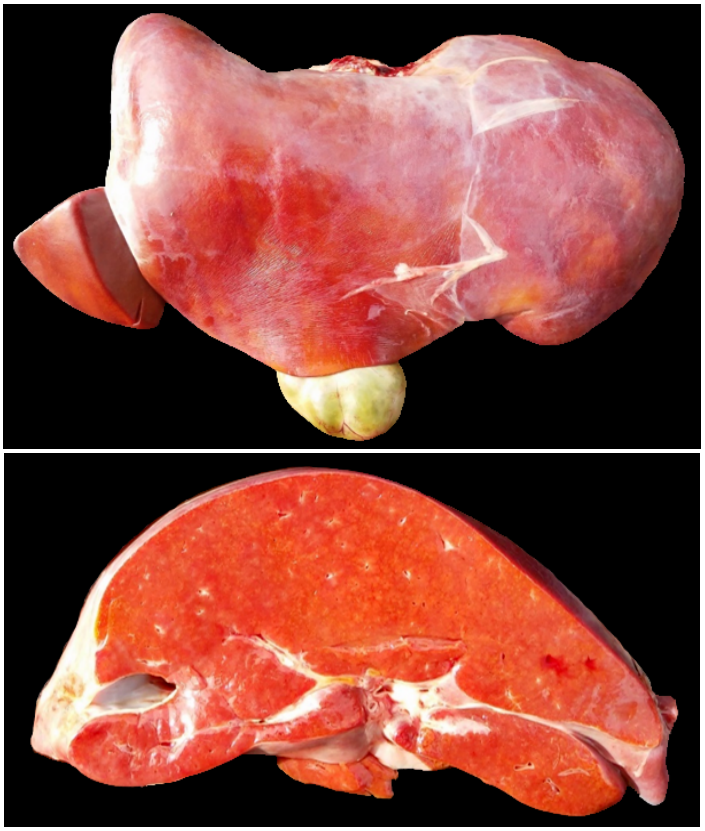

Figura 5. Ternero A, brote D. El hígado presenta bordes redondeados (hepatomegalia) y decoloración ocre difusa del parénquima (colestasis), la superficie de corte (abajo) presenta numerosos focos coalescentes diseminados pálidos de bordes poco demarcados, de aproximadamente 1 mm (hepatitis). *Salmonella* Typhimurium.

Figura 6. Ternero A, brote J. La glándula adrenal del lado izquierdo de la foto presenta extensa hemorragia cortical, que no se aprecia en la glándula adrenal del lado derecho de la imagen. *Salmonella* Dublin.

Figura 7. Ternero A, brote J. El bazo, in situ, se presenta difusamente agrandado (esplenomegalia), se aprecia además decoloración amarillenta del tejido adiposo mesentérico y subcutáneo (ictericia). *Salmonella* Dublin.

9.2.5. Lesiones microscópicas halladas en órganos de terneros con salmonelosis

En los 17 animales con salmonelosis examinados histológicamente (microscópicamente) se encontró enteritis en 17/17 (Figs. 8-9), hepatitis en 15/16 (Fig. 10), hemorragias adrenales en 7/13, neumonía intersticial en 1/16 (Fig. 11), linfadenitis en 10/13, esplenitis en 6/16 (Fig. 12), abomasitis en 5/7, rumenitis/reticulitis en 2/8, lesiones en la vejiga urinaria en 3/6, nefritis en 3/16, y meningitis o perivasculitis de la rete mirábile en 3/14. No se apreciaron lesiones microscópicas cardíacas en 15/15 animales. Estos resultados se resumen en la Tabla XV.

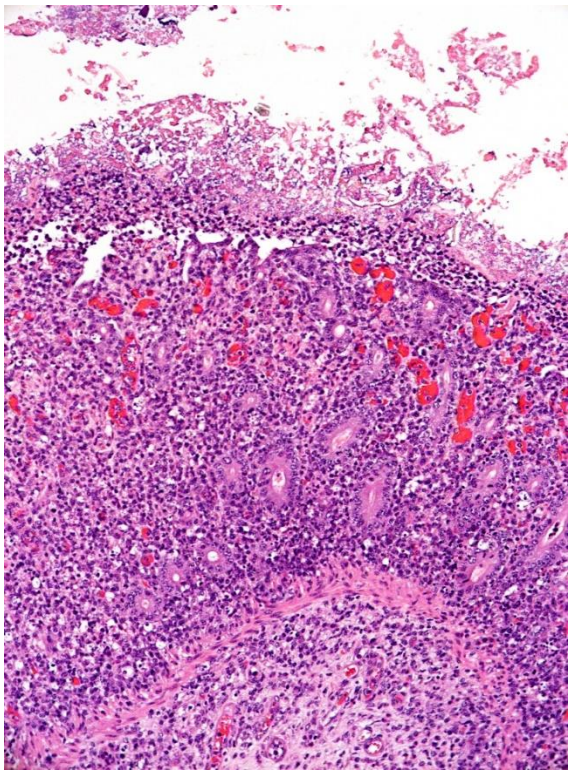

Figura 8. Ternero A, brote A. Se aprecia abundante exudado fibrinoso y supurativo/neutrofílico con restos celulares necróticos adherido a la superficie luminal del colon, formando una seudomembrana (arriba). La lámina propia y submucosa subyacentes se encuentran infiltradas por numerosos neutrófilos. *Salmonella* Typhimurium. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina.

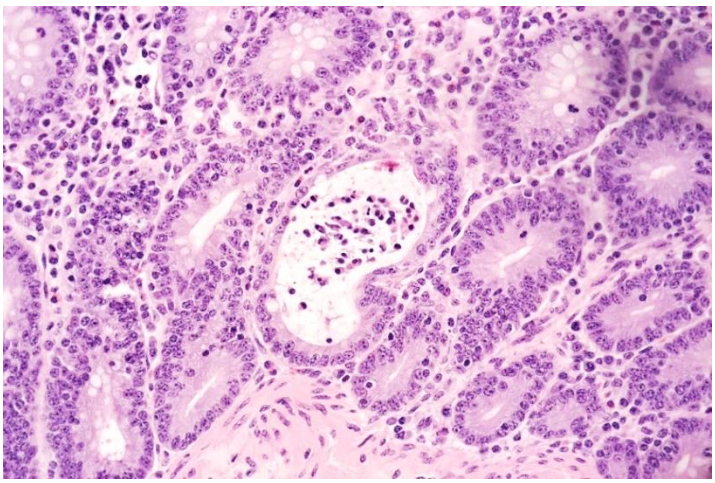

Figura 9. Ternero B, brote J. Una cripta colónica (centro) se encuentra dilatada, delimitada por epitelio atenuado y contiene restos de enterocitos necróticos y neutrófilos (criptitis). *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina.

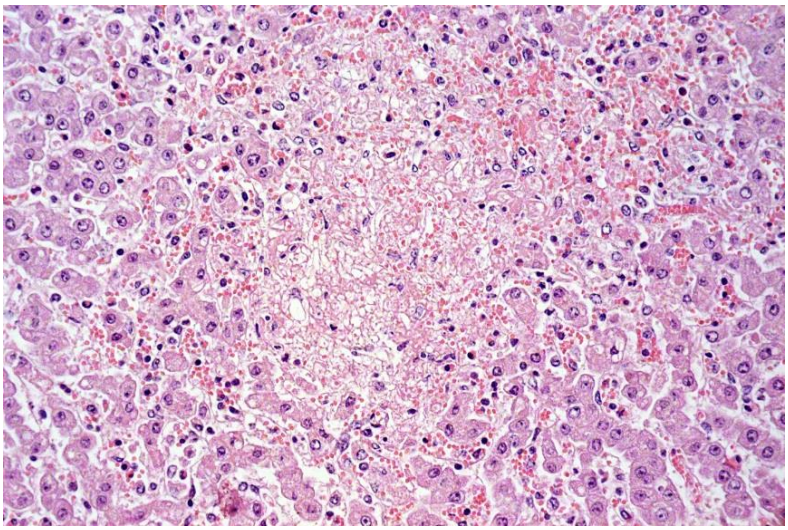

Figura 10. Ternero B, brote J. Hepatitis necrotizante, fibrinosa y neutrofílica severa aguda. *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina.

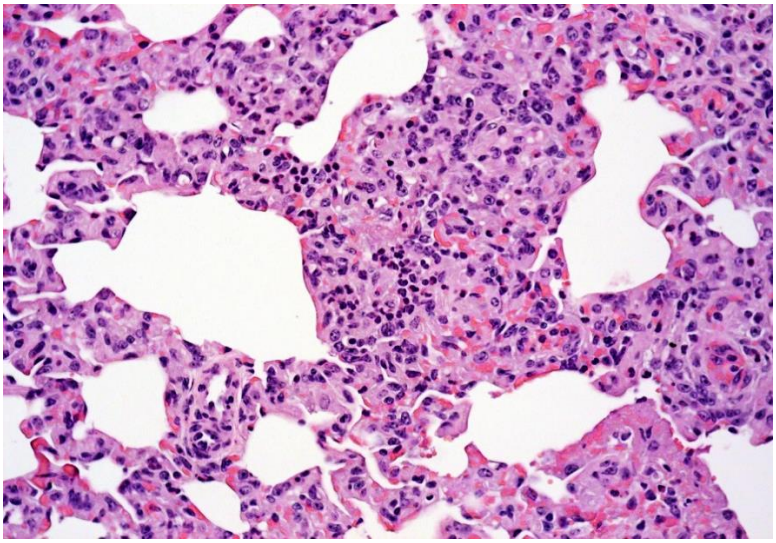

Figura 11. Ternero B, brote J. Pulmón. Los septos alveolares se encuentran expandidos e infiltrados por numerosos neutrófilos y macrófagos, se aprecia además exudado fibrinoso en la luz de un alvéolo (abajo, derecha). *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina.

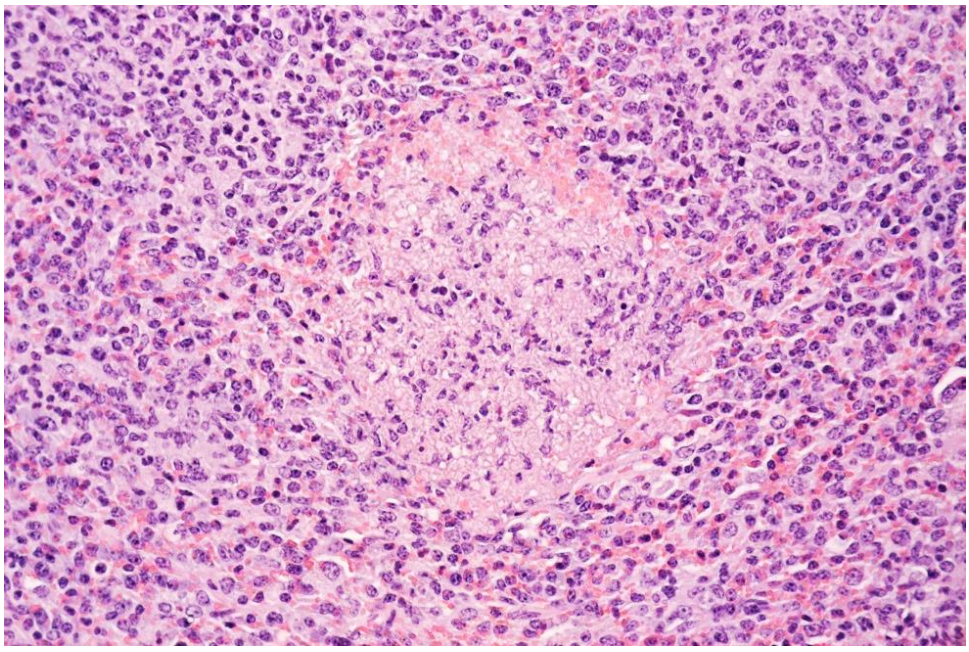

Figura 12. Ternero A, brote J. Foco de esplenitis fibrinosa, necrotizante y neutrofílica en la pulpa roja. *Salmonella* Dublin. Microfotografía, coloración de hematoxilina y eosina.

En resumen, el estudio patológico macro y microscópico en los 17 terneros permitió identificar lesiones inflamatorias/necrotizantes entéricas en 17/17, hepatitis en 15/16, hemorragias adrenales en 7/16, neumonía intersticial en 12/16, linfadenomegalia/linfadenitis en 12/16, esplenomegalia/esplenitis en 7/16, abomasitis/edema abomasal en 8/15, rumenitis/reticulitis en 2/15, lesiones en la vejiga urinaria en 2/15, serositis o artritis fibrinosa en 10/16, nefritis en 3/16, y meningitis o perivasculitis de la rete mirábile en 3/16. Por el contrario, no se detectaron lesiones cardiacas en ninguno de 16 animales examinados.

Tabla XV. Lesiones histológicas detectadas en 17 terneros necropsiados con salmonelosis.

	Animal, serotipo aislado	Enteritis*	Hepatitis**	Hemorragia adrenal	Pulmón***	Linfadenitis (fibrinosa, neutrofílica, y/o necrotizante)	Esplenitis (fibrinosa, neutrofílica, y/o necrotizante)	Abomaso ****	Pre-estómagos (rumenitis/reticulitis pustular)	Corazón	Vejiga *****	Riñón ******	Cerebro o rete mirábile *******
A	A, ST	+, A, B	+, A, C	+	+, A	+	-	+, A, B	NR	-	NR	-	-
	B, ST	+, A, B	+, B, C	+	+, A	+	-	NR	NR	-	NR	-	-
B	A, ST	+, A, B	+, B	+	+, A	-	-	+, A, B	-	-	-	-	-
	B, ST	+, A, B	+, B	-	+, A, B	-	-	NR	+	-	NR	-	-
C	A, ST	+, A, B	+, B	-	+, A, C	NR	-	NR	+	-	NR	-	+, B
D	A, ST	+, A, B; C	+, A	-	+, A, B	+	+	-	NR	-	+, A	-	-
E	A, ST	+, A, B	+, A	NR	-	+	-	NR	-	-	-	-	NR
F	A, ST	+, A, B	+, B, C	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	A, ST	+, A, B	+, A, B	NR	-	+	+	NR	NR	-	NR	-	-
H	A, ST	+, A, B	+, A, B, C	-	+, A, B, C	+	-	+, A	-	-	-	-	-
I	A, ST	+, A, B, C	+, B	-	+, A	NR	+	NR	NR	-	NR	-	-
J	A, SD	+, A, B	NR	+	+, A, B, C	+	+	-	-	-	+, B	-	+, B
	B, SD	+, A, B	+, A	+	+, A, B, C	NR	+	NR	-	-	+, A	+	NR
K	A, ST	+, A, B, C	-	+	-	NR	-	NR	NR	NR	NR	+	-
	B, ST	+, A, B, C	+, B	+	-	+	-	+, A, B	NR	-	NR	-	-
	C, ST	+, A, B	+, B	NR	+, A	+	-	NR	NR	-	NR	-	-
L	A, SD	+, A, B	+, A	-	+, A, B	-	+	+, A, B	-	-	NR	+	+, A

* Incluye enteritis, colitis, tiflitis o combinaciones (enterocolitis, enterotiflitis, tiflocolitis o enterotiflocolitis) fibrinosa, supurativa o fibrinosupurativa (A) con necrosis epitelial (erosiones/úlceras) /criptitis necrotizante (B), y/o microtrombosis (C).
** Incluye hepatitis necrotizante focal o multifocal aleatoria neutrofílica/histiocítica (A), hepatitis portal (B) o colestasis en los canalículos o conductos biliares (C).
*** Incluye neumonía intersticial neutrofílica/histiocítica multifocal (A), con edema alveolar o alveolitis/bronquiolitis fibrinosa/neutrofílica (B), y microtrombosis en los capilares alveolares (C).
**** Incluye abomasitis intersticial (A) con necrosis del epitelio glandular o superficial (B).
***** Incluye microhemorragias en la mucosa/submucosa (A) y urocistitis neutrofílica/histiocítica multifocal (B).
****** Nefritis túbulointersticial neutrofílica/histiocítica multifocal.
******* Incluye meningitis (A) o perivasculitis de la rete mirabile (B), fibrinosa/neutrofílica.
NR: no reportado.
ST: *Salmonella* Typhimurium; SD: *Salmonella* Dublin

9.2.6. Susceptibilidad antimicrobiana de S. enterica aislada de órganos y contenido intestinal de casos de mortalidad de terneros

Para realizar el análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de este estudio, se seleccionó un aislamiento de cada ternero necropsiado con salmonelosis. De total de 19 aislamientos, se selecionaron 17 de linfonódulo mesentérico, 1 de hígado y 1 de intestino (Tabla XVI).

Sobre el total de 19 aislamientos, 1 (5,26%) fue sensible a todos los antibióticos ensayados. Este aislamiento pertenecía al serotipo *S*. Dublin. El resto de la colección, que incluye a todos los aislamientos de *S*. Typhimurium, presentó alta frecuencia de resistencia a tetraciclinas (84,21%) y estreptomicina (89,47%). Frente a ciprofloxacina y colistina hubo mayor porcentaje de aislamientos con sensibilidades intermedias, con valores de 52,63% y 38,64%, respectivamente. Todos los aislamientos fueron sensibles a la fosfomicina.

Tabla XVI. Muestra de origen de los aislamientos de *S. enterica* seleccionados de cada brote y caso de mortalidad de terneros.

Brote	Ternero	Origen de aislamiento
A	A	Ln. Mesentérico
	B	Ln. Mesentérico
	C	Ln. Mesentérico
	D	Ln. Mesentérico
B	A	Ln. Mesentérico
	B	Ln. Mesentérico
C	A	Ln. Mesentérico
D	A	Ln. Mesentérico
E	A	Ln. Mesentérico
F	A	Ln. Mesentérico
G	A	Ln. Mesentérico
H	A	Intestino
I	A	Ln. Mesentérico
J	A	Ln. Mesentérico
J	B	Ln. Mesentérico
K	A	Hígado
K	B	Ln. Mesentérico
K	C	Ln. Mesentérico
L	A	Ln. Mesentérico
Total 12	Total 19	

Catorce aislamientos (73,7%), presentaron multirresistencia. Se destacan 4 aislamientos que presentaron susceptibilidad disminuida a 5 grupos de antibióticos, y 5 aislamientos que presentaron susceptibilidad disminuida a 4 grupos (Tabla XVII). De los 14 aislamientos multirresistentes, 14 tuvieron resistencia frente a la tetraciclina, 14 a la estreptomicina y 10 sensibilidad intermedia a la ciprofloxacina. Se observó una gran variabilidad de patrones de resistencia, lo que permitió diferenciar 11 grupos diferentes.

Tabla XVII. Caracterización de los patrones de resistencia a antibióticos hallados en aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos de órganos o contenido intestinal de terneros necropsiados.

Cantidad de grupos de antibióticos	Patrones de resistencia*	N° de aislamientos
3	S-TE-CT	1
	S-TE-CIP	1
	S-TE-CTX	1
	S-TE-F	1
4	S-TE-CIP-AMP-AMC	1
	S-TE-CIP-CT	1
	S-TE-NA-CIP-ENR-F	2
	S-TE-CT-F	1
	S-TE-CIP-F	1
5	S-TE-CIP-CT-F	3
	S-TE-NA-CIP-CT-AMP-AMC	1

Se presentan los aislamientos que poseen diferentes patrones de resistencia. *AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CTX: cefotaxina, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENR: enrofloxacina, C: cloranfenicol, S: estreptomicina, CN: gentamicina, TE: tetraciclina, CT: colistina, FOS: fofomicina, F: nitrofurantoína, AZM: azitromicina

10. DISCUSIÓN

La salmonelosis es una de las principales enfermedades bacterianas infecciosas que afectan al ganado bovino (Holschbach & Peek, 2017), produciendo cuantiosas pérdidas productivas y económicas, que llevan a un impacto negativo en la producción bovina lechera (El-Seedya et al. 2016). Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en el rodeo, conocer su frecuencia y los síndromes asociados representa el primer eslabón para establecer si es necesario tomar medidas para controlar o prevenir la salmonelosis, que eventualmente impacten positivamente sobre la salud y producción animal. En este trabajo se determinó, por primera vez en forma sistematizada, la implicancia de *S. enterica* como responsable de enfermedad neonatal y muerte de terneros en tambos de Uruguay. Además, se analizaron los serotipos y los perfiles de sensibilidad a antimicrobianos en las cepas circulantes.

Se detectó *S. enterica* en el 30% (9) de estos sistemas de crianza de terneros muestreados en el estudio I. El 4,04% de las 544 heces de terneros analizadas por cultivo bacteriológico fueron positivas a *S. enterica* y de estos el 72,7% (16 terneros) presentaba diarrea neonatal. A pesar de esto, no hubo una asociación estadísticamente significativa entre la diarrea y la infección por este agente, aunque sí entre la infección y otros parámetros clínicos indicativos de enfermedad neonatal, tales como la presencia de fibrina en las heces, fiebre, actitud anormal de los terneros, reducción en su capacidad de incorporación y del reflejo de succión. En abordajes comparables realizados en Argentina en sistemas de cría artificial de terneros, la frecuencia de detección de este agente en materia fecal fue similar, aunque levemente mayor (6,4%, 46 terneros, 29 de los cuales manifestaban diarrea) (Bilbao et al. 2012), que la encontrada en el presente trabajo.

Los terneros positivos a *S. enterica* en el estudio I, se encontraban en mayor número dentro la 1° y 2° semana de vida. Este es un período crítico en la vida de los terneros, donde la falla de la transferencia pasiva de inmunidad (inmunidad calostral), representa un factor de riesgo para la ocurrencia enteropatías, aunque estas también se observan en animales mayores (Tyler et al. 1999; McGuirk 2008; Bilbao et al. 2012).

Paralelamente durante los meses en el que se realizó el estudio II, se registraron un total de 44 consultas por mortalidad de terneros. El 27,3% de estos brotes fue causado por *Salmonella enterica,* con diarrea como el principal, pero no el único, signo clínico antes de la muerte. Las muertes se registraron entre los días 1 y 45 de vida, esto se encuentra asociado con múltiples factores de riesgo del huésped y del ambiente que predisponen a enfermedades, e incluso

con la virulencia bacteriana, que afectan la sobrevida de los terneros en el período de crianza (Tsolis et al. 1999; Tyler et al. 1999).

Se conocen las características invasivas de *S. enterica* y su capacidad de generar septicemia. En el presente trabajo se obtuvieron aislamientos de *S. enterica* de múltiples órganos y/o contenido intestinal en el 20,53% de los 336 órganos procesados, de al menos un ternero (caso) de cada brote incluido. Por esto último, se consideraron casos de infecciones sistémicas/septicémicas (invasivas) y/o entéricas. La mayor parte de los aislamientos se obtuvo de linfonódulo mesentérico (23% de las muestras procesadas), seguido por contenido intestinal con un 16%, hígado con 15% y pulmón con 14%. Estas frecuencias pueden explicarse por las características de la salmonelosis invasiva causada por *S*. Typhimurium (Santos et al. 2001), el serotipo más frecuente en los casos de este trabajo.

Vieiria-Pinto et al. (2005) obtuvieron el mayor éxito de aislamientos a partir de linfonódulo mesentérico, tal como se apreció en nuestro estudio. Además, se aislaron cepas de *S. enterica* de otras muestras tales como hígado (11/16), pulmón (9/16), contenido intestinal (6/7), lo que indica que estas son muestras adecuadas para el cultivo de este agente con fines diagnósticos en casos de necropsia. El cultivo bacteriano sigue siendo la técnica de referencia, aún frente a las tecnologías más avanzadas como la detección por PCR (Shanmugasamy et al. 2011; Gonzalez Pedraza et al. 2014). En un estudio realizado por Love & Rostagno (2008) a partir de heces de cerdos con diferentes medios de cultivo, la sensibilidad del cultivo arrojó un valor comprendido entre el 40 y 70%. En general, el cultivo de *Salmonella* a partir de heces tiene baja sensibilidad de acuerdo con esto último, la frecuencia de aislamiento obtenida en este estudio podría haber sido mayor. La utilización de medios de enriquecimiento como el caldo tetrationato es fundamental para incrementar las oportunidades de aislar la bacteria. En nuestro trabajo (estudio I) se obtuvieron aislamientos de *S. enterica* de 6 muestras de materia fecal (2,3%) de terneros que no presentaban diarrea, siendo por tanto portadores y eliminadores de la bacteria al medio ambiente al momento del muestreo.

El cultivo bacteriológico permite una evaluación fenotípica y epidemiológica más profunda de los aislamientos, pero tiene la desventaja de que su procesamiento insume al menos 5 días, lo que retrasa la rápida implementación de medidas terapéuticas (Janyapoon et al. 2000). La detección y amplificación por PCR del gen *invA* es de suma utilidad para brindar un resultado rápido. Este gen, implicado en la virulencia de *Salmonella,* está relacionado a la invasión del epitelio intestinal y es una herramienta importante de diagnóstico ya que es un componente estable y específico de este género bacteriano (Rahn et al. 1992; Chacón et al. 2010). Esta metodología se utilizó en este estudio como método confirmatorio de la presencia de *Salmonella* a partir de colonias aisladas.

Salmonella Typhimurium fue el serotipo que se detectó con mayor frecuencia en los aislamientos de materia fecal, representando el 5,34% (14/262) del total de heces de terneros diarreicos, y 1,77% del total de terneros neonatos no diarreicos con aislamiento de *S. enterica* de materia fecal del estudio I.

Como se mencionó, también se encontraron 3 aislamientos de *S.* Anatum en heces de 3 terneros en el estudio I. Este serotipo no es uno de los comúnmente reportados como agente causal de enteritis o mortalidad por *Salmonella* en terneros, pero se ha identificado en alimentos contaminados (Gragg et al. 2013). En este trabajo dos aislamientos se obtuvieron de dos animales con diarrea y fiebre. Estos signos son característicos de la enfermedad entérica por *Salmonella.* Sin embargo, uno de los animales a partir de cual también se aisló *S.* Anatum no presentaba signos clínicos. En estos tres animales también se detectó rotavirus grupo A (Caffarena 2017), lo que también podría explicar la diarrea. Por lo anterior, el rol que cumple *S.* Anatum como causal de diarrea neonatal es cuestionable.

En los brotes de mortalidad del estudio II se detectaron los serotipos *S.* Typhimurium (83,3%, 10 brotes, 16 terneros) y *S.* Dublin (16,6%, 2 brotes, 3 terneros). Se detectaron dos brotes de mortalidad por *S.* Dublin en terneros de 6 y 8 semanas de vida, con signos respiratorios y lesiones severas en los pulmones, hígado y linfonódulos mesentéricos, lo que se asemeja a resultados experimentales obtenidos por Segall & Lindberg, 1991. En terneros jóvenes, este serotipo causa de septicemia, fiebre, signos respiratorios y muerte, al igual que *S.* Typhimurium, tiene la capacidad de causar diarrea, pero con menor respuesta inflamatoria entérica (Santos et al. 2001; Carrique-Mas et al. 2010; Costa et al. 2012).

Independientemente del serotipo y de la presentación clínica, se pudo observar que, en todos los casos, los órganos más afectados en diferentes grados de severidad fueron el intestino delgado y/o grueso, linfonódulo mesentérico, hígado/vesícula bilar, pulmón y bazo. En menor medida se detectaron lesiones en el abomaso, rumen, vejiga urinaria, riñones, saco pericárdico, articulaciones y encéfalo, como es de esperar en casos de infección invasiva/septicemica. Estas lesiones, en términos generales, concuerdan con lo reportado en la literatura (Santos et al. 2001; Tsolis et al. 1999; Uzal 2015). La detección de estas lesiones se relaciona con la invasión y capacidad de generar septicemia de estas cepas, e indica su potencial de causar lesiones severas y episodios de mortalidad. El análisis de la presencia y la expresión de factores de virulencia de las cepas circulantes asociadas a las lesiones encontradas podrían asistir en la comprensión de los mecanismos de invasión y patogenicidad.

En el estudio I se observó fibrina en las heces de los terneros diarreicos, y en el estudio II se apreció enteritis fibrinosa/necrotizante en los terneros necropsiados. *Salmonella enterica* ejerce una acción nociva sobre las células de

la mucosa intestinal, que conduce a hemorragia aguda, extravasación de fibrina y exudado inflamatorio hacia la luz intestinal (Mohler et al. 2009). Frente a los parámetros clínicos evaluados, se observó que hubo una asociación estadísticamente significativa entre la capacidad de incorporación del ternero, el reflejo de succión, y la infección. Teniendo en cuenta el proceso inflamatorio y necrotizante intestinal y la pérdida de fluidos y electrolitos que se produce por la diarrea, es de esperar que los terneros se deshidraten, se acidifique su medio interno y, como consecuencia de la acidosis, sus respuestas a estímulos estén disminuidas (Smith 2009).

El género *Salmonella* es muy diverso, comprendiendo actualmente más de 2500 serotipos. Las respuestas inmunológicas del hospedero varían según el serotipo de *Salmonella* y su patogenicidad (Wallis & Galyov 2000). Para lograr una protección inmune adecuada se han desarrollado vacunas que generan respuesta inmune celular y humoral (Lindberg & Robertsson 1983; Mastroeni et al 2001). Las vacunas vivas son más eficaces para el control de infección debido a la respuesta celular que generan (Norimatsu et al. 2004). Generalmente los terneros están expuestos a *Salmonella* durante los primeros días de vida, lo que limita la oportunidad de desarrollar y expresar la inmunidad adquirida vacunal (Mohler et al. 2009).

En este trabajo, se encontró una mayor frecuencia de aislamiento de *S.* Typhimurium tanto en brotes de diarrea como de mortalidad. Teniendo en cuenta que las vacunas que se comercializan en Uruguay están formuladas con cultivos inactivados de *S.* Dublin, y que el serotipo más frecuente detectado en este estudio fue *S*. Typhimurium, esto genera el interrogante de la ausencia de protección contra el serotipo más frecuente, sin embargo, estudios más profundos deberían realizarse para evaluar la efectividad de la protección vacunal.

Muchos de los antibióticos empleados en animales son utilizados como tratamiento de infecciones en el hombre. Se estima que una de las fuentes de *Salmonella* multirresistentes que alcanzan al hombre, es la población animal (Mather et al. 2013). En el presente trabajo se evaluó la resistencia y multirresistencia antimicrobiana a 9 grupos de antibióticos, y se detectó que los aislamientos procedentes de materia fecal y órganos presentaron similares perfiles de resistencia. Los antibióticos utilizados para el tratamiento de las diarreas fueron diversos, incluso dentro del mismo establecimiento, tanto en principios activos como en formulación y presentación. Se observó una mayor frecuencia de resistencia frente a las tetracilinas, estreptomicina, ampicilina, y se presentó un porcentaje elevado de sensibilidades intermedias a ciprofloxacina y colistina.

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos muy utilizado en Uruguay para tratar infecciones en bovinos. Debido a su amplio espectro de acción, son

administrados para tratar infecciones respiratorias, digestivas y urinarias (Teuber 2001), entre otras. En ciertas partes del mundo las tetraciclinas son utilizadas como promotores de crecimiento (McEwen & Fedorka-Cray 2002), pero en Uruguay su uso con ese fin está prohibido desde el año 2011 (MGAP 2015). En la colección de este trabajo el 90% de los aislamientos de *S. enterica* obtenidos de heces y el 80% de los obtenidos de órganos, fueron resistentes a este antibiótico. Esto podría indicar que la utilización terapéutica continua en el tiempo de este fármaco puede haber logrado una presión de selección llevando a la adquisición y tranferencia de plásmidos con factores de resistencia en *S. enterica*, y potencialmente en otros géneros bacterianos.

Por otro lado, también se encontró resistencia a los aminoglucósidos, particularmente a la estreptomicina. Este antibiótico no fue utilizado en gran medida en los establecimientos, pero se detectó resistencia en 82% de los aislamientos obtenidos de heces y órganos. A pesar de su baja utilización en los establecimientos visitados, la alta frecuencia de cepas resistentes a este antibiótico, al igual que la tetraciclina, podría deberse a la tranferencia de manera conjunta (Pezzella et al. 2004) de estos dos tipos de resistencia en plásmidos conjugativos entre diferentes microorganismos (Hamada et al. 2002; López Cuevas et al. 2009)

El tercer grupo de resistencia más frecuente fue a ampicilina, en un 22% de los aislamientos obtenidos de muestras de heces, pero casi no se observó resistencia en los aislamientos obtenidos de muestras de órganos. Los reportes de resistencia de *S. enterica* a β-lactámicos, principalmente a cefalosporinas de tercera generación, son abundantes (Michael & Schwarz 2016; Awosile et al. 2018). Sin embargo, la frecuencia de utilización de β-lactámicos como tratamiento en este trabajo fue escasa, lo que puede explicar una frecuencia de 20% en la resistencia a este grupo de drogas.

Las quinolonas son una de las terapias de elección frente a las infecciones por *S. enterica* tanto en seres humanos como animales (Fàbrega et al. 2009), (Poirel et al. 2012). La ciprofloxacina es una quinolona fluorada utilizada en medicina humana, al igual que la enrofloxacina usada en veterinaria, las cuales pueden producir resistencia cruzada y fallas terapéuticas en aislamientos resistentes a una u otra droga (Hervé-Claude et al. 2017). Múltiples estudios se han enfocado en detectar los mecanismos que confieren resistencia a este grupo de drogas (Tamag et al. 2011; Humphries et al. 2012; Poirel et al. 2012). En este trabajo se observó un alto porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia a ciprofloxacina en aislamientos obtenidos de heces (72,7%) y órganos (52,6%), y una frecuencia de 9% de cepas con resistencia tanto para el ácido nalidíxico, como para la enrofloxacina. Éste último antibiótico se utilizó en 22 de los 30 establecimientos visitados en el estudio I. Como resultado de la terapia con quinolonas, pueden haberse seleccionado cepas de *S. enterica* resistentes, y la alta frecuencia de utilización puede haber llevado a la adquisición de

determinantes de resistencia. Dentro de los múltiples mecanismos de resistencia a quinolonas, uno de los más importantes responsables de la sensibilidad intermedia detectada en ciprofloxacina, podría estar relacionado con mutaciones en el gen *gyr*A (Tadesse et al. 2018). Estos niveles de sensibilidad a fluoroquinolonas podrían dar paso a la selección de mutantes con alto nivel de resistencia (Piddock et al. 1998).

En los últimos años se ha producido la emergencia de microorganismos multirresistentes en medicina humana. Las fallas terapéuticas y la ausencia de la formulación de nuevas drogas han llevado a cambios en la terapia, volviendo a utilizar compuestos que estaban en desuso (Anjum et al. 2016, Schwartz et al. 2016). Tal es el caso de la colistina, utilizada como último recurso frente a bacterias multirresistentes y en medicina veterinaria frente a afecciones por enterobacterias (Kempf et al. 2016). En este estudio se detectó una sensibilidad intermedia del 27,2% en aislamientos de heces y un 36.84% en aislamientos de órganos. Si bien la técnica de difusión no es la de referencia para detectar cepas resistentes a colistina, frente a los datos obtenidos, es necesario realizar un estudio más detallado de marcadores moleculares de resistencia que pueden poseer estas cepas. En la actualidad, se cuestiona la utilización de colistina en medicina veterinaria, con el fin de preservar este recurso antimicrobiano para la medicina humana (Kemf et al. 2016).

Considerando la multirresistencia (Magiorakos et al. 2012), en este trabajo se detectó en un 90% (n=20) de los aislamientos de heces y en un 73,6% (n=14) de los aislamientos de órganos. Las resistencias en los aislamientos comprendieron de 3 a 6 grupos de antibióticos y además se observó una gran diversidad de fenotipos, logrando detectar 23 patrones de resistencia diferentes, considerando ambos estudios. Existen diferentes nichos ecológicos que pueden contener bacterias resistentes y sus características pueden transferirse a otros microorganismos. Además de los problemas en salud animal que implica la multirresistencia, el hallazgo de estos organismos constituye un potencial problema de salud pública, ya que potencialmente pueden llegar al hombre principalmente por contaminación de alimentos (Argudin et al. 2017). La presencia de *S. enterica* multirresistente está asociada con alta morbilidad y mortalidad comparado con aquellos aislamientos sensibles, promoviendo mayor virulencia de la bacteria (Brunelle et al. 2013).

La alta diversidad en los fenotipos de resistencia a antimicrobianos puede indicar que estos microorganismos contienen diversos mecanismos de resistencia coexistiendo en su acervo genético, hecho que alerta por el potencial de transferencia a otros microorganismos (Scaria 2011). Por lo tanto, frente a las implicancias de la resistencia en salud pública y animal, es necesario promover el uso adecuado de antibióticos, y realizar una vigilancia activa (Aarestrup 2015) de los mecanismos de resistencia en bacterias de origen animal (Martins da Costa et al. 2013).

11. CONCLUSIONES

Salmonella enterica causa enfermedad neonatal y es frecuentemente responsable de mortalidad de terneros en tambos de Uruguay, aunque la infección no estuvo estadísticamente asociada con diarrea neoatal específicamente en el estudio I.

Salmonella enterica es un patógeno presente en el rodeo bovino lechero uruguayo. La mayor frecuencia de brotes de enfermedad neonatal y/o mortalidad se presentó en las primeras dos semanas de vida y el serotipo mayormente detectado fue *S.* Typhimurium. Las vacunas disponibles comercialmente en el país para bovinos están formuladas para lograr protección frente a *S.* Dublin. La baja edad de los terneros afectados indicaría que los terneros no están recibiendo suficiente inmunidad calostral frente a *S.* Typhimurium y que los mismos están expuestos al patógeno desde temprana edad.

Hubo una asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Salmonella enterica y* parámetros clínicos como la manifestación de fiebre y la presencia de fibrina en las heces de terneros diarreicos. También hubo una asociación entre la infección por este agente y actitud anormal de los terneros, así como disminución de la capacidad de incorporación y el reflejo de succión.

Las lesiones halladas en los brotes de mortalidad fueron diversas y afectaron múltiples órganos, lo que indica las características de virulencia e invasividad que presentan las cepas circulantes, ocurriendo tanto casos entéricos como septicémicos.

La frecuencia de aislamientos resistentes a antibióticos fue alta, y muchos de estos aislamientos fueron multirresistentes. Esta característica implica la necesidad de atender los protocolos terapéuticos utilizados frente a los brotes como así también profundizar en el estudio de los determinantes de resistencia que estas cepas portan.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarestrup F. (2015). The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370: 20140085.

2. Acha, PN, Szyfres, B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3rd Edition, Pan American Health Organization, Washington DC, Scientific and Technical Publication. 580: 1-2

3. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adenubi OT. (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical review. Folia Microbiol 56:497-503.

4. Alexander TW, L. J. Yanke LJ, Topp E, Olson ME, Read RR, Morck DW, McAllister TA. (2008) J Appl Environ Microbiol 74:4405–4416.

5. Amaral-Phillips DM. (2012). Early identification of sick dairy calves important to their survival and future milk production. Disponible en: http://articles.extension.org/pages/65519/early-identification of sick dairy calves important to their survival and future milk production.

6. Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, Rogers J, Horton R, Brena C, Williamson S, Martelli F, Davies R, Teale C. (2016) Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. J Antimicrob Chemother 71:2306-13.

7. Aráoz V, Umpierrez A, Fraga M, Casaux ML, Caffarena RD, Castells M, Fernández M, Colina R, Zunino P, Riet-Correa F, Giannitti F. (2017). Enteropatía por *Escherichia coli* enteropatogénica y *Cryptosporidium* spp. en una ternera de un rodeo lechero, con circulación de Rotavirus grupo A en Uruguay. Congreso Nacional de Biociencias, 12-14 de mayo, Montevideo, Uruguay.

8. Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C, Roisin S. (2017). Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics Basel 6: 12.

9. Awosile B, McClure J, Sanchez J, Rodriguez-Lecompte JC Keefe G, Heider LC. (2018). *Salmonella enterica* and extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* recovered from Holstein dairy calves from 8 farms in New Brunswick, Canada. J Dairy Sci 101:3271-3284.

10. Bauer A, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45:493-496.

11. Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR, Moreira AR, Auza N, Mattion N, Micheo GL, La Torre JL, Scodeller EA. (1990). Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev Arg Microbiol 22:130-6.

12. Bilbao GN, Monteavaro CE, Pinto de Almeida Castro AM, Soto P. (2012). Prevalencia de *Salmonella* spp. en terneros de la Cuenca lechera Mar y Sierras, Buenos Aires, Argentina. XIX Reunión Científico Técnica de la AAVLD, 7-9 de noviembre Ciudad de Bs. As., Argentina

13. Brunelle BW, Bearson SM, Bearson BL. (2013). Tetracycline accelerates the temporally-regulated invasion response in specific isolates of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. BMC Microbiol 11:13:202.

14. Caffarena RD, Fraga M, Castells M, Colina R, Schild CO, Riet-Correa F, Giannitti F. (2016) Detección de agentes causales de diarrea neonatal bovina en 2 tambos de Colonia, Uruguay. XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, 9 y 10 de junio, Paysandú, Uruguay.

15. Caffarena RD. (2017). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la diarrea neonatal en terneros de tambos de Uruguay y su asociación con infección por *Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

16. Carson FL, Cappellano CH. (2015). Histotechnology. A Self-Instructional Text. Ed. ASCP Press 4th Ed. Chicago.

17. Carrique-Mas JJ, Willmington JA, Papadopoulou C, Watson EN, Davies RH. (2010). *Salmonella* infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. Vet Rec 167:560–565.

18. Carvalho JG, Carvalho AU, Heinemann MB, Coelho SG, Paes PRO, Moreira GHFA, Vespasiano LC, Facury Filho EJ. (2014). Estudo longitudinal da infecção por enteropatógenos em bezerros neonatos, com diarreia, sob diferentes estratégias de aleitamento. Pesq Vet Bras 34:529-5365.

19. Castells M, Schild C, Caffarena D, Giannitti F, Fraga M, Riet-Correa F, Victoria M, Colina R. Drinking water: a potential vehicle for rotavirus transmission in neonate calves. III Latin American Symposium of Environmental Virology, 1-3, June, Salta, Argentina.

20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2018). National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems for Enteric bacteria (NARMS). Tracking antibiotic resistance in dangerous bacteria that affect people and cattle. https://www.cdc.gov/narms/cattle-antibiotic-resistance.html

21. Chacón L, Barrantes K, García C, Achí R. (2010). Standardization of a PCR method for the detection of the *Salmonella* spp. *invA* gene in lettuce. Rev Soc Ven Microbiol 30:18-23.

22. Cho Y, Yoon KJ. (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Med Sci 15:1-17.

23. Cho YI, Han JI, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T, Yoon KJ. (2013). Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. Vet Microbiol 166:375–385.

24. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015a). Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement, 2015; M100-S25. Wayne, PA, USA.

25. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015b). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. VET01S; 3rd ed. Wayne, PA, USA.

26. Constable PD. (2004). Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. J Vet Intern Med 18:8–17.

27. Costa LF, Paixão TA, Tsolis RM, Bäumlern AJ, Santos RL. (2012). Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model. Res Vet Sci 93:1–6

28. Costa RA, Casaux ML, Caffarena RD, Macías-Rioseco M, Schild CO, Fraga M, Riet-Correa F, Giannitti F. (2018). Urocystitis and Ureteritis in Holstein Calves with Septicaemia Caused by Salmonella enterica Serotype Dublin. J Comp Pathol 164:32-36.

29. Cramer MC, Stanton AL. (2015). Associations between health status and the probability of approaching a novel object or stationary human in preweaned group-housed dairy calves. J Dairy Sci 98:7298-7308.

30. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, Barzilay EJ. Emerging Infections Program NARMS Working Group. (2011). Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrob Agents Chemother 55:1148–1154.

31. Da Silva FFP, Horvath MB, Silveira JG, Pieta L, Tondo EC. (2014). Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. Braz J Microbiol 45:17-23.

32. Dairy Calf and Heifer Association (DCHA). (2012). Gold Standards I. Production and performance standards established for Holstein calves, from birth to 6 months of age, across the United States.

http://calfology.com/sites/default/files/file-attachments/final_gold_standards_i.pdf. Acceso 2 de junio de 2017

33. Davies J and Davies D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 74: 417–433.

34. Edrington, TS, Farrow, Dowd, RF, Hagevoort, GR, Callaway, TR, Anderson, RC, Nisbet, DJ. (2012). Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. J Dairy Sci 95:8:4519-4525

35. El-Seedya FR, Abeda AH, Yannib HA, Abd El-Rahmanb SAA. (2016). Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. Beni-Seuf Univ. J Appl Sci 5:45–51.

36. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb Biotechnol 2:40-61.

37. Farfán, MJ. (2015) Biology in Clinical Diagnosis. Revista Médica Clínica Las Condes. 26:788-793.

38. Galanis E, Wong DMALF, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC, World Health Organization Global Salm-Surv. (2006). Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002. Emerg Infect Dis 12:381-388.

39. Gragg SE, Loneragan GH, Brashears MM, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Wang Rong, Schmidt JW, Brooks JC, Shackelford SD, Wheeler TL, Brown TR, Edrington TS, Brichta-Harhay DM. (2013). Cross-sectional Study Examining *Salmonella* enterica carriage in subiliac lymph nodes of cull and feedlot cattle at Harvest. Foodborne Pathog Dis 10:368–374.

40. Giannitti F, Louge Uriarte EL, Moreira AR, Cseh S, Margineda CA, Caffer MI, Odriozola E, Mendez A, Malena R, Lloberas MM, Lischinsky LH, Odeón AC. Salmonelosis asociada a hipocuprosis en vaca de cría. XVIII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD), noviembre del 2010, Mercedes, Corrientes, Argentina.

41. Grimont PAD, Weill FX. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition. Institut Pasteur, Paris, France.

42. Gonzalez Pedraza J, Pereira Sanandres N, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villarreal Camacho J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Barranquilla 30:73-9

43. Hamada K, Tsuji H, Oshima K. (2002). Identification and characterization of transferable integron-mediated antibiotic resistance among *Salmonella* serovar Typhimurium and *Salmonella* serovar Infantis isolates from 1991 to 2002. J Infect Dis 55:135-138.

44. Hanson DL, Loneregan GH, Brown TR, Nisbet DJ, Hume ME, Edrington TS. (2016). Evidence supporting vertical transmission of *Salmonella* in dairy cattle. Epidemiol Infect 144:962-7.

45. Harvey RR, Friedman CR, Crim SM, Judd M, Barrett KA, Tolar B, Folster JP, Griffin PM, Brown AC. (2017). Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin infections among humans, United States, 1968–2013. Emerg Infec Dis 23:1493–1501.

46. Heithoff DM, House JK, Thomsonb PC, Mahan MJ. (2015). Development of a *Salmonella* cross-protective vaccine for food animal production systems. Vaccine 33:100–107.

47. Hervé-Claude L, Valenzuela B, Paredes E, Moroni M, Navarrete-Talloni M.(2017). Antimicrobial resistance in *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates from calves in southern Chile. Rev MVZ Córdoba 22:6191-6203.

48. Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Vet Res 42:34

49. Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA, Cohen ML. (1984). Drug-Resistant *Salmonella* from animals Fed Antimicrobials. N Engl J Med 311:617-622.

50. Holschbach CL, Peek SF. (2017). *Salmonella* in dairy cattle. Vet Clin North Am Food Anim Pract 34:133-154.

51. Hosmer DW, Lemeshow S. (2000). Applied Logistic Regression. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. 375:45.

52. Hormaeche CE, Joysey HS, Desilva L, Izhar M, Stocker BAD. (1991). Immunity conferred by *Aro−Salmonella* live vaccines. Microb Pathog 10:149-158.

53. Humphries RM, Fang FC, Aarestrup FM, Hindler JA. (2012). In vitro susceptibility testing of fluoroquinolone activity against *Salmonella*: recent changes to CLSI standards. Clin Infect Dis 55:1107–1113.

54. Hur J, Jawale C, Lee HJ. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. Food Res Int 45:819–830.

55. Ibar MP, Vigo G, Piñeyro P, Caffer MI, Quiroga P, Perfumo C. (2009). Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y su resistencia a

los antimicrobianos en los cerdos de matadero. Rev Argent Microbiol 41:156-162.

56. Janyapoon K, Korbsrisate S, Thamapa H, Thongmin S, Kanjanahareutai S, Wongpredee N, Sarasombath S. (2000). Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis in blood cultures by a Dot Blot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Diag Lab Immunol 7:977–979.

57. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. Int J Antimicrob Agents 48:598-606.

58. Latorre MRDO. (2004). Medidas de risco e regressão logística. In: Massad E.; Menezes RX, Sileira PSP, Ortega NRS. Métodos quantitativos em medicina. Ed. Manole, Barueri.

59. Lindberg A, Robertsson JA. (1983). *Salmonella* Typhimurium infection in calves: cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. Infect Inmun 41:751-757.

60. López Cuevas O, León Félix J, Jiménez Edeza M, Chaidez Quiroz C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. Rev Fitotec Mex. 32: 119-126.

61. Lorenz I, Mee JF, Earley B, More SJ. (2011). Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. Irish Vet J 64:10

62. Love CB, Rostagno MH (2008). Comparison of five culture methods for Salmonella isolation from swine fecal samples of known infection status. J Vet Diagn Invest 20:620–624

63. Lundborg GK, Svensson EC, Oltenacu PA. (2005). Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. Prev Vet Med 68:23-143.

64. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18: 268-81.

65. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. (2003). Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. Appl Environ Microbiol 69:290.

66. McEwen S, Fedorka-Cray PJ. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis 34:S93–S106.

67. McGuirk SM. (2008). Disease management of dairy calves and heifers. Vet Clin North Am Food Anim Pract 24:139-153.

68. Margineda CA, Louge Uriarte EL, Giannitti F, Moreira AR, Odriozola ER, Cámpora L, Bodega J, Lischinsky LH, Malena R, Odeón AC. (2010). Descripción clinico-patológica de salmonelosis en terneros de tambo. VII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE), 6-8 de julio, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

69. Martins da Costa P, Loureiro L, Matos AJF. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. Int J Environ Res Public Health 10: 278–294.

70. Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. (2001). Review *Salmonella*: immune responses and vaccines. Vet J 161:132-164.

71. Mather AE, Reid SWJ, Maskell DJ, Parkhill J, M. C. Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, LemeyP, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR. (2013). Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. Science 341:1514-151.

72. Michael GB, Schwarz S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? Clin Microbiol Infect 22:968-974.

73. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) (2015). Listado de principio activos prohibidos o de uso limitado. Departamento de Control de Productos Veterinarios- DILAVE. http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/tabla_de_principios_activos_prohibidos.pdf

74. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). (2017). Anuario estadístico de DIEA 2016. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2017

75. Mohler VL, Izzo MM, House JK. (2009). *Salmonella* in calves. Vet Clin North Am Food Anim Pract 69:1:37-54.

76. Morrell EL, Moore DP, Odeón AC, Poso MA, Odriozola E, Cantón G, Paolicchi F, Malena R, Leunda RM, Morsella C, Campero CM. (2008). Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce, Argentina. Rev Argent Microbiol 40:151-157.

77. Nielsen LR. (2013). Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. Vet Microbiol 162:1-9.

78. Norimatsu M, Chance V, Dougan G, Howard C, Villarreal-Ramos B. (2004). Live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (S. Typhimurium) elicit dendritic cell responses that differ from those induced by killed *S*. Typhimurium. Vet Immunol Immunopathol 98:193–201

79. Octavia S, Lan R. (2004). The Family *Enterobacteriaceae*. En: Rosenber E, DeLong EF, Lory, S, Stackebrandt E, Thompson F (Ed.), The prokariotes., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 225-286.

80. Odriozola E, Speciale C, Achilles E, Lauge M, Malena R, Paolicchi F, Poso MA, Odeón A, G. Cantón G. (2008). Infección por *Salmonella* Newport en vacas de cría. XVII Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 28-31 de octubre, Santa Fe, Argentina.

81. Paciel D, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J, Savio E. Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). (2011). Rev Tendencias 39:47-52.

82. Pereira RN, Ávila FA, Fernandes SA. (2004). Estudio del perfil epidemiológico de la salmonelosis en becerros y sensibilidad a antibacterianos en la region de Ribeirão Preto. Ars Veterinaria 20:62-66.

83. Pereira LM, Lima CS, Foditsch C, Siler JD, Carvalho Bicalho R, Warnick Lorin D. (2018). Impacts of feeding preweaned calves milk containing drug residues on the functional profile of the fecal microbiota. Richard Van Vleck Sci Rep 8: 554.

84. Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale I, Luzzi I, Carattoli A. (2004). Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. Antimicrob. Agents Chemother 48: 903-908.

85. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. Front Microbiol 3: 24.

86. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. (2016). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. Rev Peru Med Exp 33:32-44.

87. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R III, Gyles CL. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of

Salmonella Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Prob 6:271-279.

88. Ribeiro MG, Fernandes MC, Paes AC, Siqueira AK, Pinto J, Borges AS. (2010). Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. Pesq Vet Bras 30:155-160.

89. Sánchez P, Muñoz R, Gutiérrez NP. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. Revista de Investigaciones en Ciencias Animales *Spei Domus* – Universidad Cooperativa de Colombia 8:17.

90. Santos RL, Zhang, S, Tsolis RM, Kingsley RA; Adams LG, Bäumler AJ. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect 3:1335-1344.

91. Sasías S, Martínez-Sanguiné A, Betancor L, Martínez A, D'Alessandro B, Iriarte A, Chabalgoity JA, Yim L. (2018). A naturally occurring deletion in *fliE* from *Salmonella enterica* serovar Dublin results in an aflagellate phenotype and defective proinflammatory properties. Infect. Immun doi:10.1128/IAI.00517

92. Segall AA, Lindberg A. (1991). Experimental oral *Salmonella* Dublin infection in calves. A bacteriological and pathological study. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 38:169-185.

93. Selim SA, Cullor, JS. (1997). Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. J Am Vet Med Assoc 211:1029-35.

94. Smith W. (2009). Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. Vet Clin North Am Food Anim Pract 25:55-72.

95. Snider TA, Gulla Jackson TA, Martinez Becerra FJ, Picking DR, Picking WD, Picking WL. (2014). Experimental salmonellosis challenge model in older calves Vet Microbiol 170:65-7.

96. Tadesse G, Tessema TS, Beyene G, Aseffa A. (2018). Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis. PLOS ONE 13:e0192575.

97. Tamang MD, Nam HM, Kim A, Lee HS, Kim TS, Kim MJ, Jang GC, Jung SC, Lim SK Teuber M. (2011). Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. Foodborne Pathog Dis 8:1199-206.

98. Teuber M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol 4:493–499

99. Tsolis RM, Adams LG, Ficht TA, Bäumler A J. (1999). Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. Infect Immun 67:4879-4885.

100. Tyler JW, Hancock DD, Thorne JG, Gay CC, Gay JM. (1999). Partitioning the mortality risk associated with inadequate passive transfer of colostral immunoglobulins in dairy calves. J Vet Intern Med 13:335–337.

101. Scaria J, Warnick LD, Kaneene JB, May K, Teng CH, Chang YF. (2010). Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial profiles in *Eschericia coli* and *Salmonella enterica* from the same dairy cattle farms. Mol Cell Probes 24: 325–345.

102 Schwarz S, Johnson AP. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. J Antimicrob Chemother 71:2066-2070.

103 Shanmugasamy M., Velayutham T, Rajeswar J. (2011). *InvA* gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Vet World 4:562-564.

104. Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E, Zunino P. (2016). Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. J Infect Dev Ctries 10:472-477.

105. USDA. Dairy. (2007) Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry, 1991-2007. Fort Collins: USDA-APHIS-VS, CEAH; 2008. pp. 57–61

106. Uzal FA, Plattner BL, Hosletter JM. Alimentary System. En: Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Canada: Elseiver, 2015, pp. 167-176.

107. Vieira-Pinto M, Temudo P, Martins C. (2005). Occurrence of *Salmonella* in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52: 476-81.

108. Wallis, TS, Galyov, EE. (2000). Microreview molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol Microbiol 36:997-1005.

109. World Health Organization. (2018) *Salmonella* (non-typhoidal). Reviewed January 2018 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/

110. Wikse S, Kinsel M, Field R, Holland P. (1994). Investigating perinatal calf mortality in beef herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract 10:147-166.

111. Wray C, Sojka WJ. (1978). Experimental *Salmonella* Typhimurium infection in calves. Res Vet Sci 25:139-143.

112. Yim L, Sasías S, Martínez A, Betancor L, Estévez V, Scavone P, Bielli A, Sirok A, Chabalgoity JA. (2014). Repression of flagella is a common trait in field

isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin and is associated with invasive human infections. Infect Immun 82:1465-1476.

113. Younis ED, Ahmed AM, El-Khodery SA, Osman SA, El-Naker YFI. (1999). Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. Res Vet Sci 87:373–379.

114. Zar JH. (1999). Biostatistical analysis. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, New Jersey, 663 p.

ANEXO I. Cuestionario sobre datos generales del establecimiento, datos relacionados a la crianza y datos sanitarios.

Datos generales

- Cantidad total de vacas.
- Cantidad de vacas en ordeñe.
- Tipo de preparto:
    - Individual.
    - Colectivo.
- Tiempo entre el nacimiento del ternero y la separación de la madre:
    - Menos de 12 h.
    - De 12 a 24 h.
    - Más de 24 h.
- Tipo de calostrado:
    - Calostrado natural (de la madre).
    - Calostrado artificial (mamadera – sonda bucoesofágica).
- Litros de calostro administrados las primeras 24 h de vida:
    - Sin definir.
    - Menor o igual a 4 lts.
    - Más de 4 lts.

Datos relacionados a la crianza de los terneros

- Personal destinado a la guachera:
    - Exclusivo de la guachera.
    - Además de la guachera realiza otras tareas dentro del tambo.
- Tipo de sistema de crianza utilizado:
    - Individual (estaca, corredera, corral individual, etc).
    - Colectivo (corral colectivo, etc).
    - Mixto (sistema individual en los primeros días/semanas de vida, y transición posterior a sistema colectivo).
- Rotación del sitio de la guachera:
    - No.
    - Si.
- Suministro de leche de descarte a las terneras:
    - No.

    - Si.

- Suministro de sustituto lácteo a las terneras:
    - No.
    - Si.

Datos de manejo sanitario

- Uso de vacunas contra la diarrea neonatal en el preparto:
    - No.
    - Si.
- ¿Aparta los terneros enfermos de los sanos?
    - No.
    - Si.
- Cantidad de animales entrados a la guachera en el año:
- Cantidad de animales muertos en la guachera en el año:
- Tasa de mortalidad estimada en el periodo de crianza (%):
- Tratamiento con antibióticos:
    - No.
    - Si. ¿Cuál?